(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 8 月 23 日 (23.08.2012)

W I P O | P C T

(10) 国際公開番号
WO 2012/111772 A1

(51) 国際特許分類：
C12N 15/09 (2006.01)　C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)　C07K 19/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号：PCT/JP2012/053705

(22) 国際出願日：2012 年 2 月 16 日 (16.02.2012)

(25) 国際出願の言語：日本語

(26) 国際公開の言語：日本語

(30) 優先権データ：
特願 2011-032378　2011 年 2 月 17 日 (17.02.2011)　JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について)：国立大学法人東京医科歯科大学 (National University Corporation Tokyo Medical and Dental University) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島１丁目５番４５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者；および

(73) 発明者/出願人 (米国についてのみ)：石井 智浩 (ISHII, Tomohiro) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島１丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 中田 隆夫 (NAKATA, Takao) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島１丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人：正林 真之 (SHOBAYASHI, Masayuki); 〒1000005 東京都千代田区丸の内１―７―１２ サピアタワー Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: POLYPEPTIDE, ISOLATED NUCLEIC ACID, RECOMBINANT VECTOR, GENE TRANSFER KIT, TRANSFORMANT, AND METHOD FOR REGULATING INTRACELLULAR CALCIUM SIGNALING

(54) 発明の名称：ポリペプチド、単離された核酸、組み換えベクター、遺伝子導入キット、形質転換体、および細胞内カルシウムシグナルの調節方法

[図1]

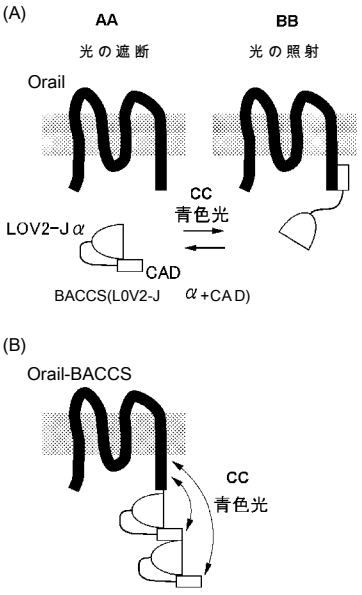


FIG. 1:
AA LIGHT BLOCKAGE
BB LIGHT IRRADIATION
CC BLUE LIGHT

(57) Abstract: Provided is a polypeptide for the optical control of calcium signaling, the polypeptide allowing for easy spatial control and manipulation of calcium signaling. This polypeptide is composed of an amino acid sequence including: an LOV2 domain composed of SEQ ID NO: 1 or an amino acid sequence having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO: 1; a Jα domain composed of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or an amino acid sequence maintaining a function as an LOV2-Ja optical switch and having a predetermined mutation in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or 3; and SEQ ID NO: 4 or a CAD domain which is able to activate the calcium channel Orail and has a predetermined mutation in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4; wherein the LOV2 domain, the Jadomain, and the CAD domain are arranged, from an N terminus to a C terminus, in the order of LOV2 domain, Ja domain, CAD domain, and wherein a polypeptide is used without an amino acid sequence interposed between the C terminus of the Ja domain and the N terminus of the CAD domain.

(57) 要約：カルシウムシグナルの空間的な制御および操作が容易な、カルシウムシグナルを光制御するポリペプチドを提供すること。配列番号１または配列番号１と８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬＯＶ２領域と、配列番号２、配列番号３、またはＬＯＶ２―Ｊａの光スィッチとしての機能を維持し、かつ配列番号２もしくは３のアミノ酸配列において、所定の変異を有するアミノ酸配列からなるＪα領域と、配列番号４、またはカルシウムチャネルＯｒａｉ１を活性化でき、かつ、配列番号４のアミノ酸配列において、所定の変異を有するＣＡＤ領域と、を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ＬＯＶ２領域、Ｊα領域およびＣＡＤ領域は、Ｎ末端からＣ末端に向かって、ＬＯＶ２領域、Ｊα領域およびＣＡＤ領域の順で配置され、Ｊα領域のＣ末端とＣＡＤ領域のＮ末端との間にアミノ酸配列が介在していないポリペプチドを使用する。

WO 2012/111772 A1

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可肯^: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

– 国際調査報告 (条約第21条(3))

– 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称　：

ポリペプチド、単離された核酸、組み換えベクター、遺伝子導入キット、形質転換体、および細胞内カルシウムシグナルの調節方法

技術分野

[0001] 本発明は、カルシウムシグナルを光制御するポリペプチド、単離された核酸、組み換えベクター、遺伝子導入キット、形質転換体、および細胞内カルシゥムシグナルの調節方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、基礎医学研究において、細胞内シグナルの機能等の解明のために、光刺激によって細胞内シグナルを制御するシステムが使用されてきている（非特許文献１;非特許文献２）。例えば、神経機能研究の分野においては、このようなシステムとして、光刺激によって神経細胞の膜電位を変化させることができるチャネルロドプシン2（バクテリア由来の光受容イオンチヤネル）が使用されている。

[0003] また、光刺激によって細胞内シグナルを制御するシステムとして、目的の細胞シグナルタンパク質の機能ドメインと、植物等に由来するタンパク質に含まれる光感受性領域とを融合することによって作製されたポリペプチドも使用される。このようなポリペプチドの具体的な例として、オートムギの光受容体タンパク質であるフォトトロピン１由来の光感受性領域ＬＯＶ２—Ｊひと、動物の細胞骨格制御タンパク質Ｒａｃ１との融合タンパク質が挙げられる。当該融合タンパク質は、光の照射によって局所的に細胞の形態を変化させることができる（非特許文献３）。

[0004] 細胞内シグナルの中でも、カルシウムシグナルは、カルシウムチャネルを介して、受精、細胞増殖、発生、学習と記憶、筋収縮および分泌等の様々な細胞機能において重要な作用を有することが知られており、生体内のほぼ全ての細胞において重要な機能を有する（非特許文献４）。そのため、カルシ

ゥムシグナルを光刺激によって制御できるシステムの確立が熱望されており（非特許文献５）、このようなシステムの確立のために様々な試みがなされてきた。

[0005] 光刺激によってカルシウムシグナルを制御する従来のシステムとしては、ケージドカルシウムを使用したシステムが挙げられる（非特許文献１；非特許文献２）。ケージドカルシウム等のケージド化合物は、光刺激によって分解される有機合成分子である。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献１：Kramer, R. H., Fortin, D. L. & Trauner, D. New photochemical tools for controlling neuronal activity. Curに Opin. Neurobioに 19, 544-552 (2009)

非特許文献２：Rana, A. & Dolmetsch, R. E. Using light to control signaling cascades in live neurons. Curr. Opin. Neurobiol. 20, 617-622 (2010)

非特許文献３：Wu, Y. ら A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living eells. Nature 461, 104-108 (2009)

非特許文献４：Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. Nat. Rev. Moに CellBiol. 1, 11-21 (2000)

非特許文献５：Liu, X. & Tonegawa, S. Optogenetics 3.0. Cell 141, 22-24 (2010)

発明の概要

発明が解決しょうとする課題

[0007] ケージドカルシウムを使用したシステムによれば、カルシウムシグナルを迅速に活性化させることができるものの、ケージドカルシウムは低分子であるために拡散しやすく、カルシゥムシグナルの空間的な制御が容易ではない。また、ケージドカルシウムを使用したシステムにおける、ケージドカルシゥムを細胞外から導入する工程は操作が難しく、特に動物等への応用において限界があった。

[0008] 本発明は、上記現状に鑑み、カルシウムシグナルを容易に光制御できるポリペプチド、単離された核酸、組み換えベクター、遺伝子導入キット、形質転換体、および細胞内カルシゥムシグナルの調節方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、オートムギ由来の光感受性タンパク質であるフォトトロピンのＬＯＶ２—Ｊα領域のアミノ酸配列の所定部分と、カルシウムチャネルＯｒａｉ１の制御タンパク質であるＳＴＩＭ１のＣＡＤ領域のアミノ酸配列の所定部分とを組み合わせたポリペプチドにより、上記課題を解決できることを見出した。

[001 0] すなわち、本発明は、

配列番号１または配列番号１と８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ０Ｖ２領域と、

配列番号２、配列番号３、またはＬＯＶ２＿Ｊαの光スィッチとしての機能を維持し、かつ配列番号２もしくは３のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＪα領域と、

配列番号４からなるＣＡＤ領域と、またはカルシウムチャネル０ｒａｉ１を活性化でき、かつ配列番号４のアミノ酸配列において、１もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるＣＡＤ領域と、を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、

上記ＬＯＶ２領域、上記Ｊα領域および上記ＣＡＤ領域は、Ｎ末端からＣ末端に向かって、上記ＬＯＶ２領域、上記Ｊα領域および上記ＣＡＤ領域の

順で配置され、

上記Ｊα領域のＣ末端と上記ＣＡＤ領域のＮ末端との間にアミノ酸配列が介在していないポリペプチド（ＢＡＣＣＳ）を提供する。

[001 1] また、本発明者らは、カルシウムチャネルＯｒａｉ１のアミノ酸配列と、ＢＡＣＣＳとを組み合わせたポリペプチドによっても上記課題を解決できることを見出した。

[001 2] すなわち、本発明は、

配列番号５、またはカルシウムチャネルとして機能でき、かつ、配列番号５のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなる０ｒａｉ１領域と、

第１のＢＡＣＣＳ領域と、

第２のＢＡＣＣＳ領域と、を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、

上記０ｒａｉ１領域、上記第１のＢＡＣＣＳ領域および上記第２のＢＡＣＣＳ領域は、Ｎ末端からＣ末端に向かって、上記０ｒａｉ１領域、上記第１のＢＡＣＣＳ領域および上記第２のＢＡＣＣＳ領域の順で配置されるポリペプチド（Ｏｒａｉ１-ＢＡＣＣＳ）も提供する。

[001 3] ０ｒａｉ１_ＢＡＣＣＳにおける上記０ｒａｉ１領域のＣ末端と上記第１のＢＡＣＣＳ領域のＮ末端の間には第１のリンカーが介在してもよい。

[0014] ０ｒａｉ１_ＢＡＣＣＳにおける上記第１のＢＡＣＣＳ領域のＣ末端と上記第２のＢＡＣＣＳ領域のＮ末端の間には第２のリンカーが介在してもよい。

[001 5] また、本発明者らは、ＢＡＣＣＳをタンデムに２つつなげたポリペプチドによっても上記課題を解決できることを見出した。

[001 6] すなわち、本発明は、

第１のＢＡＣＣＳ領域と、

第２のＢＡＣＣＳ領域と、を含み、かつ、

配列番号５またはカルシウムチャネルとして機能でき、かつ、配列番号５

のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなる０ｒａｉ１領域を含まないアミノ酸配列からなるポリペプチド（ＢＡＣＣＳＸ２）も提供する。

[001 7] ＢＡＣＣＳＸ２における上記第１のＢＡＣＣＳ領域のＣ末端と上記第２のＢＡＣＣＳ領域のＮ末端の間にはリンカーが介在してもよい。

[001 8] 本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸も提供する。

[001 9] 本発明はまた、上記核酸を含む組み換えベクターも提供する。

[0020] 本発明はまた、上記組み換えベクターを含む遺伝子導入キットも提供する。

[0021] 本発明はまた、上記組み換えベクターを含み、単離された細胞または非ヒト動物である形質転換体も提供する。

[0022] 本発明はまた、上記形質転換体に照射する光の強度を操作することによつて、上記形質転換体の細胞内カルシゥムシグナルを調節する細胞内カルシゥムシグナルの調節方法も提供する。

[0023] 本発明はまた、上記ポリペプチドが、ＢＡＣＣＳであり、かつ、上記細胞が０ｒａｉｌを発現している細胞内カルシウムシグナルの調節方法も提供する。

[0024] 本発明はまた、上記ポリペプチドが０ｒａｉｌ—ＢＡＣＣＳである細胞内カルシウムシグナルの調節方法も提供する。

発明の効果

[0025] 本発明によれば、カルシウムシグナルを容易に光制御できるポリペプチドが提供される。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]（Ａ）は、「ＢＡＣＣＳ」の模式図を示し、（Ｂ）は、「０ｒａｉ１_ＢＡＣＣＳ」の模式図を示す。

[図2A]様々な動物種における０ｒａｉ１、０ｒａｉ２および０ｒａｉ３のアミノ酸配列の比較を示す。

[図2B]様々な動物種におけるＳＴＩＭ１のＣＡＤ領域のアミノ酸配列の比較を示す。

[図3]様々な植物種におけるＬＯＶ２＿Ｊαにおける Ｊα領域のアミノ酸配列の比較を示す。

[図4]（Ａ）は、ＬＯＶ２—Ｊαの明変異体にＣＡＤ領域を融合したタンパク質（ＬＯＶ Ｌｉｔ-ＣＡＤ）の模式図を示す。（Ｂ）は、黄色蛍光タンパク質を組み込まれた０ｒａｉＬ（Ｏｒａｉ１＿ＹＦＰ）のＨＥＫ２９３細胞中の局在のイメージング（左図）、赤色蛍光タンパク質を組み込まれたＬＯＶ Ｌｉｔ-ＣＡＤ（ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＬＯＶ-ＣＡＤ）のＨＥＫ２９３細胞中の局在のイメージング（中央図）、およびこれらの２つの結果をマージした結果（右図）を示す。（Ｃ）は、ＣＡＤ領域のＮ末端側を様々に欠損させたことによる、ＬＯＶ Ｌｉｔ＿ＣＡＤの細胞膜への移行の有無についての結果を示す。

[図5]（Ａ）は、ＬＯＶ２—Ｊαの暗変異体にＣＡＤ領域を融合したタンパク質（ＬＯＶ ｄａｒｋ-ＣＡＤ）の模式図を示す。（Ｂ）は、黄色蛍光タンパク質を組み込まれた０ｒａｉ１（０ｒａｉ１—ＹＦＰ）のＨＥＫ２９３細胞中の局在のイメージング（左図）、赤色蛍光タンパク質を組み込まれたＬ０Ｖ ｄａｒｋ-ＣＡＤ（ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＬＯＶ ｄａｒｋ-ＣＡＤ）のＨＥＫ２９３細胞中の局在のイメージング（中央図）、およびこれらの２つの結果をマージした結果（右図）を示す。（Ｃ）は、Ｌ０Ｖ２＿Ｊαの暗変異体によるＣＡＤ領域の機能の阻害を妨げない（すなわち、ＬＯＶ ｄａｒｋ＿ＣＡＤを細胞膜へ局在させない）Ｊα領域のアミノ酸配列についての４つの候補（膜への局在化が「なし」であるもの）の同定結果を示す。

[図6]（Ａ）は、ポリペプチド（ｔｄＴｏｍａｔｏ＿ＬＯＶ（４０４-５３８）-ＣＡＤ（３４７-４４８））、０ｒａｉ１およびＮＦＡＴ—ＧＦＰを共発現させたＨＥＫ２９３細胞中における、光を遮断した場合のポリペプチドの局在のイメージング（上図）、および４７０ｎｍの光（青色光）を２０分照射した場合のポリペプチドの局在のイメージング（下図）を示す。（Ｂ）

は、ＬＯＶ２領域のアミノ酸配列、様々なＪα領域のアミノ酸配列、およびＣＡＤ領域のアミノ酸配列を結合させたポリペプチド（ＬＯＶ—ＣＡＤ）による、ＮＦＡＴ転写因子の核移行の有無、およびＬ０Ｖ＿ＣＡＤの細胞膜への移行の有無の結果を示す。

[図7]（Ａ）は、赤色蛍光タンパク質、ＢＡＣＣＳ、２Ａペプチドおよび０ｒａｉ１を順にＮ末端からＣ末端へ融合させたポリペプチド（ｍＣｈｅｒｒｙ－ＢＡＣＣＳ－２Ａ－０ｒａｉ１）をＨＥＫ２９３細胞中で発現させ、４７０ｎｍの光（青色光）を試験期間中継続して照射した後の、カルシウム蛍光プローブであるＦｌｕｏ＿４を使用したカルシウムイメージング結果を示す。左図はｍＣｈｅｒｒｙの蛍光による、ポリペプチド発現細胞の同定結果を示す。中央図および右図は、それぞれ、光刺激前および光刺激後のカルシウムイメージング結果を示す。（Ｂ）は、８つの細胞におけるカルシウム濃度の経時変化を示す。

[図8]（Ａ）は、赤色蛍光タンパク質を組み込まれた０ｒａｉ１－ＢＡＣＣＳ（０ｒａｉ１—ｍＣｈｅｒｒｙ－ＢＡＣＣＳｘ２）をＨＥＫ２９３細胞中で発現させ、４７０ｎｍの光（青色光）を試験期間中継続して照射した後の、カルシウム蛍光プローブであるＦｌｕｏ＿４を使用したカルシウムイメージング結果を示す。左図はｍＣｈｅｒｒｙの蛍光による、ポリペプチド発現細胞の同定結果を示す。中央図および右図は、それぞれ、光刺激前および光刺激後のカルシウムイメージング結果を示す。（Ｂ）は、ＨＡタグおよび/または蛍光物質を組み込まれた０ｒａｉｌ—ＢＡＣＣＳを発現したＨＥＫ２９３細胞におけるカルシウム濃度の経時変化を示す。（Ｃ）は、ＨＡタグおよび蛍光物質を組み込まれた０ｒａｉ１－ＢＡＣＣＳ（０ｒａｉ１—ＨＡ—ＢＡＣＣＳＸ２－ＩＲＥＳ－ＹＦＰ）をＨＥＫ２９３細胞に発現させ、光の照射および光の遮断を３回行った際の、赤色蛍光カルシウムセンサーであるＲｈｏｄ＿３を用いたカルシウムイメージングによって観察された細胞内カルシウム濃度の経時変化を示す。

[図9]（Ａ）は、Ｏｒａｉ１にＢＡＣＣＳを１つだけ融合させ、赤色蛍光タン

パク質を組み込んだポリペプチド (Ｏｒａｉ１-ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳＸ１) および転写因子ＮＦＡＴに黄色蛍光タンパク質を組み込んだポリペプチド (ＮＦＡＴ—ＹＦＰ) をＨＥＫ２９３細胞中で共発現させ、４７０ｎｍの光 (青色光) を２０分間照射した後の結果を示す。 (Ｂ) は、対照実験として、ＢＡＣＣＳを2つタンデムにつなげ、赤色蛍光タンパク質を組み込んだＯｒａｉｌ—ｔｄＴｏｍａｔｏ—ＢＡＣＣＳＸ２、ＮＦＡＴ-ＧＦＰをＨＥＫ２９３細胞中で共発現させ、４７０ｎｍの光 (青色光) を２０分間照射した後の結果を示す。

[図10] (Ａ) は、０ｒａｉ１—ＢＡＣＣＳに、０ｒａｉ１の変異 (０ｒａｉ１ (Ｌ２７３Ｄ)) を組み込んだ０ｒａｉ１ (Ｌ２７３Ｄ)-ＢＡＣＣＳＸ２の模式図を示す。 (Ｂ) は、ＨＡタグおよび蛍光物質を組み込まれた０ｒａｉ１ (Ｌ２７３Ｄ)-ＢＡＣＣＳ (０ｒａｉ１ (Ｌ２７３Ｄ)-ＨＡ-ＢＡＣＣＳＸ２-ｉｇＹ) を発現するＨＥＫ２９３細胞に、４７０ｎｍの光 (青色光) を照射する前、および１０分間照射した後の、赤色蛍光カルシウムセンサーであるＲｈｏｄ＿３を使用したカルシウムイメージングを示す。

[図11] (Ａ) は、ＳＴＩＭ１のＣＤＩ (Ｃａｌｃｉｕｍ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｏｎ) 領域を含むようにＣＡＤ領域のＣ末端を伸長したポリペプチド (Ｏｒａｉ１-ＢＡＣＣＳ (３４７-６３０) Ｘ２) の模式図を示す (斜線部がＣＤＩ領域を示す)。 (Ｂ) は、ＨＡタグおよび蛍光物質を組み込まれた０ｒａｉ１-ＢＡＣＣＳ (Ｏｒａｉ１-ＨＡ-ＢＡＣＣＳＸ２-ｉｇＹ) およびＯｒａｉ１-ＢＡＣＣＳ (３４７-６３０) (０ｒａｉ１—ＨＡ—ＢＡＣＣＳ (３４７-６３０) Ｘ２-ｉｇＹ) を発現した細胞について、赤色蛍光カルシウムセンサーであるＲｈｏｄ＿３を使用したカルシウムィメージング結果を示す。

[図12] (Ａ) は、「ＢＡＣＣＳＸ２」の模式図を示す。 (Ｂ) は、ＢＡＣＣＳｘ２-ｉｇＹ (Ｂｘ２) および０ｒａｉ１—ＨＡ—ＢＡＣＣＳＸ２—ｉｇＹ (０ＢＸ２) を発現した細胞それぞれについてのカルシウムイメージング結果を示す。

[図13] ＢＡＣＣＳＸ２－ｉｇＹ（ＢＸ２）およびＹＦＰ―ＢＡＣＣＳＸ２（ＹＢＸ２）を発現した細胞についてのカルシウムイメージング結果を示す。

発明を実施するための形態

[0027] （ＢＡＣＣＳ）

本発明は、オートムギの光受容体タンパク質であるフオトトロピン１の光感受性領域であるＬＯＶ２＿Ｊα領域のアミノ酸配列と、カルシウムチヤネル０ｒａｉ１の制御タンパク質であるＳＴＩＭ１のＣＡＤ領域のアミノ酸配列と、を含むポリペプチド（Ｂｌｕｅ ｌｉｇｈｔ-ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃａｌｃｉｕｍ Ｃｈａｎｎｅｌ Ｓｗｉｔｃｈ、以下「ＢＡＣＣＳ」と呼ぶ）を提供する。ＢＡＣＣＳを発現させた細胞においては、細胞中の内在性のＯｒａｉ１、または細胞に遺伝子導入することによってＢＡＣＣＳと共に発現させた０ｒａｉ１を、青色光の照射によって開くことができる。青色光の照射によって活性化された０ｒａｉ１は、青色光を遮断することで不活性の状態に戻る。また、ＢＡＣＣＳは、本発明の属する技術分野において公知の遺伝子組み換え技術によって容易に細胞特異的に発現させることができるため、Ｏｒａｉ１の活性を局所的に制御できる。従って、ＢＡＣＣＳによれば、カルシウムシグナルの空間的な制御を容易に行うことができる。また、ＢＡＣＣＳは、照射する光の強度の操作のみによつてその機能を制御できるため、容易な操作によってカルシウムシグナルを制御することができる。

[0028] （ＬＯＶ２-Ｊα）

オートムギ由来のフオトトロピン１の光感受性は、フォトトロピン１中のアミノ酸４０４-５４３位の領域に依存しており、当該領域はＬＯＶ２-Ｊαと呼ばれる（Ｈａｒｐｅｒら、２００３）。ＬＯＶ２＿Ｊαは、青色領域である４４７ｎｍの吸収極大波長を有するため（Ｓａｌｏｍｏｎら、２０００）、青色光の照射によって構造が変化する。具体的には、光が遮断されている状態では、ＬＯＶ２領域およびＪα領域が疎水結合によって結合している。一方、光が照射されている状態では、ＬＯＶ２領域およびＪα領域の疎水結合が外れる。これを 明状態」と呼ぶ。ＬＯＶ２―Ｊαにシグナルタン

パク質が融合した状態では、光が遮断されている状態において、ＬＯＶ２—Ｊαがシグナルタンパク質の立体障害として機能する。一方、光が照射されている状態では、Ｌ０Ｖ２＿Ｊαの構造が変化し、シグナルタンパク質の立体障害が解消される。その結果、所望の細胞内シグナルを生じさせることができる。

[0029] Ｌ０Ｖ２-Ｊαを明状態にするための光は、青色領域の波長 (５１０ｎｍ以下)であればよい。例えば、市販の青色ＬＥＤを使用することによってＬＯＶ２＿Ｊαの構造を容易に変化させることができる。また、光の照射時間は特に限定されないが、ミリ秒単位の照射によって、ＬＯＶ２＿Ｊαを効率よく明状態にすることができる (Ｎａｋａｓｏｎｅら、２００８)。

[0030] また、Ｌ０Ｖ２＿Ｊαの明状態を解除するためには、照射する光の波長を５１０ｎｍよりも長波長にするか、光を遮断すればよい。

[0031] [ＬＯＶ２領域]

本発明のポリペプチドを構成するＬ０Ｖ２＿Ｊαのうち、Ｌ０Ｖ２領域は、オートムギ由来のフオトトロピンのアミノ酸配列の４０４-５２２位に対応する。

[0032] ＬＯＶ２領域は、多くの植物間で保存されており、例えば、オートムギのＬＯＶ２領域のアミノ酸配列との相同性は、アジアイネのフオトトロピン１；８１%、シロイヌナズナのフオトトロピン１；８７%、シロイヌナズナのフォトトロピン２；８３%、エンドウマメのフォトトロピン１；８７%、ソラマメのフォトトロピン１；トウモロコシのフォトトロピン１；９５%、トマトのフォトトロピン１；８７%である。

[0033] ＬＯＶ２領域が機能的である植物種のＬＯＶ２領域は、オートムギのアミノ酸配列と８０%以上の配列同一性を有している。このようなアミノ酸配列を用いることによって、ＢＡＣＣＳが光感受性作用を発揮できると考えられる。アミノ酸配列にＬＯＶ２領域の機能に関わる領域が含まれているかどうかは、例えば、得られるポリペプチドに対して青色光を照射または遮断し、円偏光二色性スペクトルを観察することによって特定できる。従って、オー

トムギのＬＯＶ２領域を様々な植物種由来の配列または合成配列に置き換えることも可能である。例えば、本発明のポリペプチドを構成するＬＯＶ２領域に相当するアミノ酸配列として、オートムギ由来のフォトトロピンのアミノ酸配列の４０４＿５２２位と、８０％以上、８５％以上、９０％以上、または９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を使用することができる。

[0034] [Ｊα領域]

本発明のポリペプチドを構成するＬＯＶ２＿Ｊαのうち、Ｊα領域は、オート ムギ由来のフォトトロピンのアミノ酸配列の５２３－５３５位または５２３－５３８位に対応する。

[0035] Ｊα領域は、ＢＡＣＣＳが、光の照射によって０ｒａｉｌを開き、光の遮断によって０ｒａｉｌを閉じるという所望の反応（以下、このような反応を「光スイッチ」と呼ぶ）をするために重要な領域である。なぜならば、ＢＡＣＣＳにおけるＪα領域のアミノ酸配列は、Ｏｒａｉ１の制御タンパク質であるＣＡＤ領域のアミノ酸配列との間にアミノ酸配列を介在させずに直接結合しているため、この結合部位の構造によっては、光の遮断状態においてシグナルタンパク質であるＣＡＤ領域の立体障害が解消されてしまう。その結果、光の遮断状態においてもＣＡＤ領域が０ｒａｉｌに結合し、０ｒａｉ１が活性化されることになり、Ｏｒａｉ１の制御タンパク質としてのＣＡＤ領域の機能が阻害されないからである。例えば、これまで、ＬＯＶ２＿Ｊαの４０４＿５４６位（Ｗｕら、２００９）および４０４—５４３位（Ｓｔｉｃｋｌａｎｄら、２００８）を使用した光感受性ポリペプチドが作製されてきたものの、光を遮断した際にも光スイッチが完全には切れず、シグナルが遮断されない等の問題があった。これは、ＬＯＶ２領域の存在によって生じる、シグナルタンパク質のシグナル機能部位における立体障害が不十分であることによるものと考えられる。

[0036] Ｊα領域としてフォトトロピンのアミノ酸配列５２３－５３５位または５２３—５３８位を有するＢＡＣＣＳは、光に対する所望の反応を示す。これ

らの配列を有するＢＡＣＣＳは、細胞において、青色光の照射によって、カルシゥムシグナルを調節することができるため好ましい。Ｊα領域としてフオトトロピンのアミノ酸配列５２３-５３８位を有するＢＡＣＣＳは、光に応答してカルシウムシグナルを強く調節できるため特に好ましい。Ｊα領域としてフォトトロピンのアミノ酸配列５２３-５３５位を有するＢＡＣＣＳも、光を遮断した状態でカルシウムシグナルを誘導してしまうものの、光の照射によってシグナルの強さを調節することができる。

[0037] また、Ｌ０Ｖ２_Ｊαが機能するためにはＪα領域のＩ５３２、Ａ５３６、Ｉ５３９のァミノ酸が疎水性である必要があることが報告されている (Ｈａｒｐｅｒら、２００４）。そのため、ＢＡＣＣＳを作製する際には、Ｊα領域におけるこれらの部位が疎水性アミノ酸になるようにする必要がある。例えば、ＢＡＣＣＳを構成するアミノ酸配列においては、Ｌ０Ｖ２—Ｊα（４０４-５３８）とＣＡＤ領域のつなぎ目に位置する、疎水性アミノ酸である『Ｌ（ロイシン）」が、Ｌ０Ｖ２_Ｊαの光スィッチとしての機能に重要な役割を果たしている。つまり「し」はＣＡＤ領域に由来するが、同時に、Ｌ０Ｖ２—Ｊαの５３９番目のアミノ酸としても機能している。この「し」は、Ｊα領域と直接結合しているＣＡＤ領域が０ｒａｉｌを活性化させる場合においても重要である。このため、光を遮断した状態においては、Ｊα領域のこの「し」は、Ｌ０Ｖ２領域との疎水結合に利用され、その結果、ＣＡＤ領域が０ｒａｉｌと相互作用することが阻害されることになる。

[0038] 本発明者らが鋭意検討した結果、フォトトロピンのアミノ酸配列の５２３-５３５位または５２３-５３８位に対応するＪα領域を有するＢＡＣＣＳであれば、照射する光の強度の操作に応じて０ｒａｉｌの活性化を制御できることを見出した。ただし、上記Ｊα領域のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列であって、Ｌ０Ｖ２_Ｊαの光スィツチとしての機能を維持するアミノ酸配列を有するＢＡＣＣＳについても、照射する光の強度の操作に応じてＣＡＤ領域の機能を発揮させ、または阻害することで、同様に所望の反応を生じさせることができるため、本発明

の範囲に含まれる。ここで、「1もしくは複数のアミノ酸配列が置換されたアミノ酸配列」とは、本発明のポリペプチドを構成するＪα領域である、オートムギ由来のフォトトロピンのアミノ酸配列の５２３-５３５位または５２３―５３８位と、８０％以上、８５％以上、９０％以上、または９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を指す。アミノ酸配列にＬＯＶ２_Ｊαの光スィツチとしての機能を維持するアミノ酸配列が含まれているかどうかは、例えば、得られるポリペプチドについて、円偏光二色性スペクトル等を観察することによって特定できる。

[0039] （ＣＡＤ領域）

本発明のポリペプチドを構成するＣＡＤ領域は、ヒトＳＴＩＭ１のＣＡＤ領域のアミノ酸配列の３４７_４４８位に対応する。当該ＣＡＤ領域は、単独でカルシウムチャネル０ｒａｉ１の活性を制御できる。ＢＡＣＣＳ中のＬＯＶ２-Ｊαが光の照射によって明状態になると、ＣＡＤ領域が活性化し、０ｒａｉ１と結合し、その結果０ｒａｉｌを活性化させる。

[0040] ただし、カルシウムチャネルＯｒａｉ１を活性化でき、かつ上記ＣＡＤ領域のアミノ酸配列において、１もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列を有するＢＡＣＣＳについても、カルシウムチャネル０ｒａｉ１の活性を制御できるため、本発明の範囲に含まれる。ここで、「1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列」とは、本発明のポリペプチドを構成するＣＡＤ領域である、ヒトＳＴＩＭ１のＣＡＤ領域のアミノ酸配列の３４７_４４８位と、８０％以上、８５％以上、９０％以上、または９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列のことをいう。アミノ酸配列にカルシウムチャネル０ｒａｉｌを活性化するアミノ酸配列が含まれているかどうかは、例えば、当該アミノ酸配列をＯｒａｉ１領域と共発現させ、カルシウムイオンの流入があるかどうかを、ＮＦＡＴの局在を観察することによって特定できる。

[0041] （０ｒａｉ１-ＢＡＣＣＳ）

また、本発明は、ＢＡＣＣＳを、カルシウムチャネル０ｒａｉ１のアミノ

酸配列のＣ末端にタンデムに２つつなげたタンパク質（以下、「０ｒａｉ１＿ＢＡＣＣＳ」と呼ぶ）も提供する。

[0042] ＢＡＣＣＳは、内在性の０ｒａｉｌが発現した場合、または細胞内で０ｒａｉ１遺伝子と共発現した場合等に、カルシウムイオンチャネルである０ｒａｉ１を光依存的に開閉することができる。そのため、０ｒａｉ１とＢＡＣＣＳを結合させ、単一のポリペプチドとして発現させることによって、Ｏｒａｉ１とＢＡＣＣＳとの空間的距離を近づけることができ、ＢＡＣＣＳのみからなるポリペプチドと比較して、さらに効率の良い光活性化カルシウムチャネルとして機能する。

[0043] ０ｒａｉ１とＣＡＤ領域が１：２の比で存在する場合に、０ｒａｉ１を効率的に活性化させることができ、さらに、Ｏｒａｉ１のＣ末端にＣＡＤ領域をタンデムに２つつなげた場合に０ｒａｉ１が構成的に活性化されることが報告されている（Ｌｉら、２０１０）。そこで、本発明者らは、０ｒａｉ１のＣ末端にＢＡＣＣＳをタンデムに２つつなげた構造を有する０ｒａｉ１-ＢＡＣＣＳを作製した。

[0044] （Ｏｒａｉ１）

カルシウムチャネルＯｒａｉ１は、細胞膜上に局在し、ストア作動性カルシウム流入に関与するストア作動性カルシウムチャネルである。Ｏｒａｉ１の活性は、小胞体に局在する小胞体タンパク質ＳＴＩＭ１のＣＡＤ領域によって制御される（Ｈｏｇａｎら、２０１０）。０ｒａｉ１は特に免疫細胞において重要な作用を有する。

[0045] ０ｒａｉ１を活性化するヒトＳＴＩＭ１内の領域として、ＣＡＤ（アミノ酸３４２—４４８位；Ｐａ「にら、２００９）、ＳＯＡＲ（アミノ酸３４４—４４２位；Ｙｕａｎら、２００９）、０ＡＳＦ（アミノ酸２３３—４５０位または４７４位；Ｍｕｉｋら、２００９）、ＣＣＢ９（アミノ酸３３９—４４４位；Ｋａｗａｓａｋｉら、２００９）が同定されている。なお、ヒトＳＴＩＭ１内のアミノ酸３４２-４４０位の領域は、０ｒａｉ１を活性化することができない（Ｐａ「にら、２００９）。

[0046] 本発明のポリペプチドを構成するＯｒａｉ１は、ヒトＯｒａｉ１のアミノ酸配列の１―３０１位に対応する。

[0047] Ｏｒａｉ１は、Ｏｒａｉ２およびＯｒａｉ３との配列類似性が高いだけでなく、線虫、ヒト等の様々な種間で保存されている (Ｈｏｇａｎら、２０１０）。そのため、Ｏｒａｉ１―ＢＡＣＣＳを構成するＯｒａｉｌの配列は、ヒト由来のものだけではなく、様々な種のホモログであっても、カルシウムチャネルとして機能する可能性が極めて高い。従って、本発明のポリペプチドを構成するＯｒａｉｌとしてこれらのホモログを代用できる。また、ヒトＯｒａｉ１がカルシウムチャネルとして機能するための領域が保存されているのであれば、ヒトＯｒａｉ１のアミノ酸配列の１―３０１位において１もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されていても、本発明のポリペプチドを構成するＯｒａｉ１として使用することができる。ここで、「１もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加」とは、本発明のポリペプチドを構成するＯｒａｉｌである、ヒトＯｒａｉ１のアミノ酸配列の１―３０１位と、８０％以上、８５％以上、９０％以上、または９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を指す。アミノ酸配列にＯｒａｉ１がカルシウムチヤネルとして機能するための領域が含まれているかどうかは、例えば、当該アミノ酸配列をＣＡＤ領域と共発現させ、カルシウムィオンの流入があるかどうかを、ＮＦＡＴの局在を観察することによって特定できる。

[0048] （リンカー）

Ｏｒａｉ１―ＢＡＣＣＳを構成する、Ｏｒａｉ１のＣ末端と第１のＢＡＣＣＳのＮ末端との間、および第１のＢＡＣＣＳのＣ末端と第２のＢＡＣＣＳのＮ末端との間にはそれぞれ、アミノ酸配列の小断片 (以下、「リンカー」と呼ぶ）が介在してもよい。当該リンカーは、蛍光タンパク質 (ｍＣｈｅｒｒｙ、ＹＦＰ等）等であってもよい。Ｏｒａｉ１―ＢＡＣＣＳにこのようなリンカーが含まれることにより、細胞内のＯｒａｉ１―ＢＡＣＣＳの発現を容易に検出することができる。

[0049] Ｏｒａｉ１のＣ末端と第１のＢＡＣＣＳのＮ末端との間に介在するリンカ

—は、立体障害を回避する観点から、２０残基以上のアミノ酸配列からなるリンカーであってもよい。

[0050] 第１のＢＡＣＣＳのＣ末端と第２のＢＡＣＣＳのＮ末端との間に介在するリンカーは、立体障害を回避する観点から、２５残基以上のアミノ酸配列からなるリンカーであってもよい。

[0051] （ＢＡＣＣＳＸ２）

また、本発明は、ＢＡＣＣＳをタンデムに２つつなげたタンパク質（以下、「ＢＡＣＣＳＸ２」と呼ぶ）も提供する。

[0052] ＣＡＤは２量体の形態で１つの０ｒａｉ１と相互作用し、０ｒａｉ１を効率的に活性化させることができることが報告されている（Ｌｉら、２０１０）。そのため、タンデムに２つつながれたＢＡＣＣＳ（すなわち、ＢＡＣＣＳＸ２）によれば、効率よくＣＡＤを２量体様の構造にすることができるため、内因性０ｒａｉｌを効率的に活性化できる。

[0053] ＢＡＣＣＳＸ２を構成する、第１のＢＡＣＣＳ領域のＣ末端と、第２のＢＡＣＣＳ領域のＮ末端との間には、リンカーが介在してもよい。ＢＡＣＣＳＸ２において、リンカーは、第１のＢＡＣＣＳ領域のＮ末端や、第２のＢＡＣＣＳ領域のＣ末端に付加されてもよい。例えば、第１のＢＡＣＣＳ領域のＮ末端のリンカーとしては蛍光タンパク質（ｍＣｈｅｒｒｙ、ＹＦＰ等）等が挙げられる。第２のＢＡＣＣＳ領域のＣ末端のリンカーとしては２Ａペプチド等が挙げられる。ＢＡＣＣＳＸ２にこのようなリンカーが含まれることにより、細胞内のＢＡＣＣＳＸ２の発現を容易に検出することができる。

[0054] ＢＡＣＣＳＸ２に含まれるリンカーは、立体障害を回避する観点から、２５残基以上のアミノ酸配列からなるリンカーであってもよい。

[0055] （製法）

本発明のポリペプチドは、本発明の属する技術分野において公知の遺伝子組み換え技術によって作製できる。例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸をベクターに組み込み、当該ベクターを大腸菌や細胞（ヒト腎臓由来のＨＥＫ２９３細胞等）等に導入することによって、ポリペプチドとして

大量に発現させることができる。

[0056] （核酸）

本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸は、本発明の属する技術分野において公知の遺伝子組み換え技術によって作製できる。例えば、アミノ酸配列情報からプライマーを作成し、ＰＣＲ等によってクローニングしたＬ０Ｖ２＿Ｊα領域をコードする核酸や、ＣＡＤ領域をコードする核酸を、ライゲーションヨン反応等によってつなげることにより本発明のポリペプチドをコードする核酸を単離することができる。

[0057] 本願明細書で使用される用語 核酸」には、ＤＮＡ、ＲＮＡ等が含まれる。

[0058] （組み換えベクター）

本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸を含む組み換えベクターは、本発明の属する技術分野において公知の遺伝子組み換え技術によって作製できる。例えば、任意のプラスミドを、任意の制限酵素（ＢｇｌＩＩ、ＳａｌＩ等）で切断し、その切断部位に、本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸をリガーゼで結合させることによって作製できる。

[0059] 本願明細書で使用される用語 組み換えベクター」は、組み換えＤＮＡ実験等において異種ＤＮＡの運搬に使用されるＤＮＡを指す。本発明の組み換えベクターとしては、例えば、本発明のポリペプチドを発現するＤＮＡ断片、任意の制限酵素認識部位、任意の複製開始点等を有するクローニングベクターや、本発明のポリペプチドを発現するＤＮＡ断片、転写開始点等を有する発現ベクター等が挙げられる。

[0060] また、本発明の範囲には、このような組み換えベクターを含む遺伝子導入キットも含まれる。当該キットを使用して遺伝子導入を行うことで、本発明のポリペプチドを容易に発現させることができる。当該キットには、例えば、本発明の組み換えベクター、形質転換用試薬、取扱説明書等が含まれるが、これに限定されない。

[0061] （形質転換体）

上記の組み換えベクターを含む形質転換体は、本発明の属する技術分野において公知の遺伝子組み換え技術によって作製できる。本願明細書で使用される用語「形質転換体」は、単離された細胞または非ヒト動物である。細胞としては特に限定されず、任意の細胞株（例えば、ヒト腎臓由来のＨＥＫ２９３細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞等）を使用できる。また、非ヒト動物としては特に限定されず、大腸菌、哺乳類（マウス、ラット等）、モデル動物等を使用できる。

[0062] 本発明の形質転換体は、例えば、単離された細胞に、エレクトロポレーション法、リポフエクション法、ウィルス等によって組み換えベクターを導入することによって、単離された細胞の形質転換体が得られる。また、非ヒト動物の受精卵前核中へＤＮＡ顕微注入、ＥＳ細胞への相同組み換え、組み換えウィルスによる感染等を行うことによって非ヒト動物の形質転換体が得られる。本発明のポリペプチドは、上記のような公知の技術によって容易に細胞特異的に発現させることができるだけでなく、追加の薬剤等を使用することなく、照射する光の強度の操作のみによってその機能を発揮させることができるため、特に、非ヒト動物に対して容易かつ安全に応用できる。

[0063] （本発明のポリペプチドを使用した応用）

さらに、本発明によれば、上記形質転換体に照射する光の強度を操作することによって、上記形質転換体の細胞内カルシウムシグナルを調節することができる。光の強度の操作とは、上記形質転換体に照射される光の波長、光の照射時間、および光の照射量等の調節を指す。例えば、上記形質転換体に対する青色領域の波長の光の照射によつて細胞内カルシゥムシグナルを活性化することができる。また、上記形質転換体に対する５１０ｎｍ以下の波長の光の遮断によって細胞内カルシウムシグナルを不活性化することができる。

[0064] 例えば、ＢＡＣＣＳを使用すれば、０ｒａｉ１を発現している細胞における細胞内カルシウムシグナルを調節できる。また、Ｏｒａｉ１- ＢＡＣＣＳを使用すれば、０ｒａｉ１を発現している細胞だけではなく、０ｒａｉ１を

発現していない細胞における細胞内カルシウムシグナルを調節できる。

[0065] ０ｒａｉ１とＣＡＤ領域が１：２の比で存在する場合に、０ｒａｉ１を効率的に活性化させることができ、細胞内カルシゥムシグナルの応答性が上昇することが知られている（Ｌｉら、２０１０）。これを踏まえると、０ｒａｉ１に対するＢＡＣＣＳの発現量比が０ｒａｉ１：ＢＡＣＣＳ＝１：２以下となると、細胞内カルシウムシグナルの応答性が低下すると考えられる。０ｒａｉ１を発現している細胞においては、内因性０ｒａｉｌに対するＢＡＣＣＳの割合がＯｒａｉｌ：ＢＡＣＣＳ＝１：２以下となりにくくするために、内因性０ｒａｉｌの量に応じて、ＢＡＣＣＳＸ２（ＢＡＣＣＳのみをタンデムに２つ発現させたもの）、ＢＡＣＣＳｘ２＿２Ａ＿０ｒａｉ１（０ｒａｉ１：ＢＡＣＣＳ＝１：２）やＢＡＣＣＳＸ２—ＩＲＥＳ-０ｒａｉ１（０ｒａｉ１：ＢＡＣＣＳ＝１：４～１：１０）等を好適に使用できる。なお、ＩＲＥＳ（ｉｎｔｅｒｎａｌ ｒｉｂｏｓｏｍｅ ｅｎｔｒｙ ｓｉｔｅ）とは、メッセンジャーＲＮＡの途中から翻訳を開始させることができる配列である。ＩＲＥＳ依存的な翻訳は、多くの場合、5' キャップ依存的な翻訳の２０～５０％の効率であることが報告されている（Ｍｉｚｏｇｕｃｈｉら、２０００）。つまり、例えばＢＡＣＣＳＸ２—ＩＲＥＳ-０ｒａｉ１においては、ＩＲＥＳ依存的な０ｒａｉ１の翻訳は、5' キャップ依存的なＢＡＣＣＳの翻訳に対して２０～５０％の効率であると予測されるため、ＩＲＥＳを含む組み換え体によれば、０ｒａｉ１とＢＡＣＣＳとの発現量比を効率的に調整できる。一方、０ｒａｉ１を発現していない細胞においては、内因性０ｒａｉ１が存在しないため、ＯｒａｉｌとＢＡＣＣＳＸ２の融合蛋白（０ｒａｉ１-ＢＡＣＣＳＸ２）を好適に使用できる。

[0066] このように、本発明によれば、照射する光の強度を操作することによって形質転換体の細胞内のカルシウムチャネルの活性化を制御することにより、細胞内カルシゥムイオンの流入の調節ができるため、細胞内カルシゥムィオン濃度やカルシウムイオンによって活性化される細胞内の生理現象（例えば、筋収縮、シナプス伝達、分泌、細胞分化等）を調節できる。

[0067] 本発明のポリペプチドは、カルシウムシグナルに関連する基礎医学または生命科学分野の研究や医薬品の開発において有利に使用することができる。本発明のポリペプチドを使用する基礎医学または生命科学の分野としては特に限定されず、筋収縮の制御、神経伝達シグナル、免疫応答、発生、および分泌制御等の分野の研究において使用できる。また、研究手法としては、ｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｉｎ ｓｉｔｕ、またはｉｎ ｖｉｖｏ等の系におしゃて使用できる。

[0068] 本発明のポリペプチドは、医薬品の開発においても使用でき、例えば、糖尿病、高血圧等の疾病における創薬ターゲットの評価、新薬候補化合物のスクリーニング等に使用できる。

実施例

[0069] 以下の実施例に基づき、本発明について詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。なお、本実施例においては、オートムギのフオトトロピン１のＬＯＶ２—Ｊα領域、ヒトの０ｒａｉ１、およびヒトのＳＴＩＭ１のＣＡＤ領域を使用した。

[0070] (実施例１ :ＬＯＶ２＿ＪαとＣＡＤの結合部位の最適化に関する検討)

ＬＯＶ２＿ＪαとＣＡＤの結合部位の配列に関して最適な組み合わせを特定するため、ＬＯＶ２＿Ｊαと、ＣＡＤとを結合させたポリペプチド(以下、「ＬＯＶ＿ＣＡＤ」と呼ぶ)を作製し、光刺激によって０ｒａｉｌを活性化できるＬＯＶ—ＣＡＤをスクリーニングした。なお、ＬＯＶ２—Ｊαの構造は、Ｊα領域のＣ末端側に結合する領域を制御すると考えられるため、ポリペプチドの作製時には、Ｌ０Ｖ２＿Ｊαの塩基配列のＣ末端側と、ＣＡＤの塩基配列Ｎ末端側とを結合させる必要がある。

[0071] (１)Ｌ０Ｖ＿ＣＡＤを発現する組み換えベクターの作製

以下に、ＬＯＶ２＿Ｊα(４０４-５３８)およびＣＡＤ(３４７-４４８)の塩基配列を組み込んだプラスミドの作製例を示す。他のポリペプチドを発現するプラスミドも同様にして作製した。なお、フォトトロピン１ Ｌ０Ｖ２-Ｊα(ＩＤ ２２０２４, ＰＡ＿Ｒａｃ１)、０ｒａｉ１-ＹＦＰ

（ＩＤ　１９７５６）、ＳＴＩＭ１—ＣＦＰ（ＩＤ　１９７５５）およびＮＦＡＴ-ＧＦＰ（ＩＤ　１１１０７）のプラスミドは、Ａｄｄｇｅｎｅ社より購入した。

ＬＯＶ—ＣＡＤを、制限酵素（ＢｇＩＩＩ）認識配列が組み込まれたＬ０Ｖ２のＰＣＲ断片と、制限酵素（ＳａＩＩ）認識配列が組み込まれたＣＡＤ領域のＰＣＲ断片との、リコンビナントＰＣＲによる融合遺伝子として得て、これをＰＣＲサーマルサイクラーによって増幅した。使用したプライマーと鋳型を以下に示す。

[0072] [表 1]

< BglII I-L0V (404-538) の増幅のために使用したプライマー >
T119 5' -GGACTCAGATCTTTGGCTACTACACTTGAACG
T177 5' -CTTCTGAAGATTTTCTGCAGTTTTCTTAATCAG
鋳型 : フォトトロピン 1 L0V2 - Tα

< CAD (347-448) -SalI の増幅のために使用したプライマー >
T178 5' -CTGCAGAAAATCTTCAGAAGTGGCTGCAGCTG
T118 5' -GGTACCGTCGACTCAGTGGATGCCAGGGTTGTTG
翻 : STIM1-CFP

< BglII-L0V (404-538) -CAD (347-448) -SalI の増幅のために使用したプライマー >
T119 5' -GGACTCAGATCTTTGGCTACTACACTTGAACG
T118 5' -GGTACCGTCGACTCAGTGGATGCCAGGGTTGTTG
鋳型 : BglII-LOV (404-538) および CAD (347- 448) - SalI

[0073] 得られたＰＣＲ産物を、ＢｇＩＩＩとＳａＩＩを使用して制限酵素処理した。次いで、制限酵素処理されたＰＣＲ産物を、赤色蛍光タンパク質レポーターベクターであるｐｔｄＴｏｍａｔｏ_Ｃ１ベクターのＢｇＩＩＩ-ＳａＩＩサイトにライゲーションし、ポリペプチドｔｄＴｏｍａｔｏ_Ｌ０Ｖ（４０４-５３８）-ＣＡＤ（３４７-４４８）の組み換えベクター（以下、「ｐｔｄＴｏｍａｔｏ_ＢＡＣＣＳ」と呼ぶ）を作製した。なお、ｐｔｄＴｏｍａｔｏ—Ｃ１ベクターは、ｐＥＧＦＰ—Ｃ１（クロンテック社製）のＧＦＰ配列をｔｄＴｏｍａｔｏで置換したものである。さらに、当該組み換えベクターから転写されるｍＲＮＡの安定性を高め、導入遺伝子の発現を増強することができる、ウッドチャック肝炎ウィルス由来の転写後制御エレメン

トWPREを3' 非翻訳領域に挿入した組み換えベクター (以下、「ptdTomato_BACCS_WPRE」と呼ぶ)を作製した。

[0074] (2)CAD領域のN末端配列に関する検討

L0V2-Jαの塩基配列に結合するCAD領域の塩基配列のN末端配列について、0rai1の活性化に必要な最小領域を検討した。

検討のために、L0V2領域の光照射条件下における構造を模倣した変異体 (以下、 明変異体」と呼ぶ)およびLOV2領域の光遮断条件下における構造を模倣した変異体 (以下、 暗変異体」と呼ぶ)を作製した。例えば、Jα領域のアミノ酸配列は、I532E、A536E、I539E、D540Rの変異によって明変異体になることが知られている (Harperら、2004)。本実施例では、明変異体として、Jα領域に、リコンビナントPCRによりI539E変異 (I539E)を導入した。また、暗変異体として、LOV2領域に、リコンビナントPCRによってC450A変異 (C450A)を導入した。以下、当該明変異体であるL0V2_Jαを、「LOV lit」、当該暗変異体であるLOV2_Jαを「LOV dark」と呼ぶ。LOV litおよびLOV darkは、それぞれ、光の照射の有無に関わらず、光が照射された状態の構造、および光が遮断された状態の構造を有している。

まず、LOV lit (404_546)に、N末端を様々に欠損させたCAD領域 (342—448から350—448)を融合したタンパク質 (以下、「LOV lit_CAD」と呼ぶ)を作製した (図4A)。LOV lit—CADを、OraiIと共にHEK293細胞中で共発現させ、以下の手順でLOV lit—CADの細胞内局在を観察した。

赤色蛍光タンパク質であるtdTomatoを、LOV lit-CADのN末端側に融合したポリペプチドとして発現するように、組み換えベクター「ptdTomato—LOV lit—CAD—WPRE」を作製した。また、同様に、黄色蛍光タンパク質をC末端側に組み込んだ0rai1を発現するように、組み換えベクター「0rai1_YFP」も作製した。p

ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＬＯＶ Ｉｉｔ-ＣＡＤ-ＷＰＲＥおよび０ｒａｉ１_ＹＦＰを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（インビトロジェン社製）を使用して、ＨＥＫ２９３細胞に遺伝子導入し、当該細胞を１０％ 仔ウシ血清（Ｇｉｂｃｏ社製）入りＭＥＭ（ナカライテスク株式会社製）（以下、「ＭＥＭ+ １０％ＦＢＳ」と呼ぶ）培地中で培養した。遺伝子導入の２４~４８時間後に、暗室において、細胞を４％ パラホルムアルデヒドで固定し、ｔｄＴｏｍａｔｏの蛍光の局在をコンフォーカル顕微鏡（商品名；Ｚｅｉｓｓ ＬＳＭ５１０、カールツアイス社製）で観察した。

０ｒａｉ１は細胞膜上に発現するため、０ｒａｉ１と結合したＬＯＶ Ｉｉｔ_ＣＡＤは、細胞膜に局在する（図４Ｂ）。なお、Ｊα領域の５４６番目のアミノ酸とＣＡＤ領域の３４７番目のアミノ酸はともに「し」であるため、ＬＯＶ Ｉｉｔ（４０４-５４６）-ＣＡＤ（３４８-４４８）はＬＯＶ Ｉｉｔ（４０４-５４５）-ＣＡＤ（３４７-４４８）とも解釈できる点に注意されたい。Ｏｒａｉ１を活性化する領域としては、ＣＡＤ（３４７-４４８）がＮ末端に関して最小領域であることが分かった。（図４Ｃ）。

[0075] （３）Ｌ０Ｖ２—Ｊαの末端配列に関する検討

ＣＡＤ領域（３４７—４４８）を含むように、ＬＯＶ ｄａｒｋのＣ末端の長さを様々に変えてポリペプチド（以下、「Ｌ０Ｖ ｄａｒｋ_ＣＡＤ」と呼ぶ）を作製した（図５Ａ）。Ｌ０Ｖ ｄａｒｋ_ＣＡＤは、Ｏｒａｉｌを活性化させるのに十分なＣＡＤ領域を含むため、ＬＯＶ ｄａｒｋのタンパク質構造による立体障害がない場合は、０ｒａｉ１と結合できる。本項では、ＬＯＶ ｄａｒｋが立体障害となり０ｒａｉｌと結合できないポリペプチドを探索する。０ｒａｉ１と結合できないＬ０Ｖ ｄａｒｋ—ＣＡＤは、細胞質に分布するポリペプチドとして認められた（図５Ｂ）。

Ｌ０Ｖ２_Ｊαの末端側の、ＣＡＤ領域とのつなぎ目に関しては、上記「(2）ＣＡＤ領域のＮ末端配列に関する検討」で説明した重要な疎水性アミノ酸（１５３２，Ａ５３６，Ｉ５３９）の配列を変化させないようにアミノ酸配列のつなげ方を工夫した。当該疎水性アミノ酸配列を変化させる場合

においても、ＬＯＶ２―Ｊα領域に結合したＣＡＤ領域の配列によってＬＯＶ２＿Ｊα領域のアミノ酸の特性が変化しないように (すなわち、Ｊα領域中の５３２番目、５３６番目、５３９番目のアミノ酸が疎水性アミノ酸になるように)アミノ酸配列のつなげ方を工夫した。

図５Ｃに示す１５種類のポリペプチドおよび０ｒａｉｌを、ＨＥＫ２９３細胞中で共発現させたところ、ＬＯＶ　ｄａｒｋ（４０４―５４２）、ＬＯＶ　ｄａｒｋ（４０４-５３９）、ＬＯＶ　ｄａｒｋ（４０４―５３８）、およびＬＯＶ　ｄａｒｋ（４０４-５３５）は、細胞膜への局在化が阻害された。

[0076] （４）光によるＯｒａｉＬ１の活性化についてのＮＦＡＴを使用した検証

本発明のポリペプチドが、光の照射によってＯｒａｉＬ１を活性化できるかどうかについて、カルシウムシグナルにより核に移行することが知られる転写因子ＮＦＡＴを使用して検証した。

まず、４つの候補の野生型ＬＯＶ（４０４―５４２、４０４―５３９、４０４―５３８、４０４-５３５）にＣＡＤ（３４７-４４８）を融合したタンパク質を、Ｏｒａｉ１、および核移行シグナルを検出するためのレポーター遺伝子ＮＦＡＴ-ＧＦＰと共にＨＥＫ２９３細胞中で共発現させた。

具体的には、３つのプラスミド、ｐｔｄＴｏｍａｔｏ―ＬＯＶ―ＣＡＤ―ＷＰＲＥ、０ｒａｉ１（Ｏｒａｉ１-ＹＦＰ（Ａｄｄｇｅｎｅ社製）からＹＦＰを除去して作製した）およびＮＦＡＴ―ＧＦＰを、ＨＥＫ２９３細胞に遺伝子導入し、当該細胞をＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ培地中で培養した。遺伝子導入から２４～４８時間後、暗室にて、４％　パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。これを暗条件における試料とし、図６に　暗」として示した。また、遺伝子導入から２４～４８時間後、培地をＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ培地からＬｅｉｂｏｖｉｔｚ'ｓ培地に変え、４７０ｎｍの光を２０分照射した後に４％　パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。これを明条件における試料とし、図６に　明」として示した。

それぞれのサンプルについて、光を遮断した場合と、４７０ｎｍの光を照

射した場合におけるＮＦＡＴの局在を観察した。ＮＦＡＴの細胞内局在をコンフォーカル顕微鏡（商品名；Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ５１０、カールツアイス社製）で観察した結果を図６Ａに示す。

Ｌ０Ｖ（４０４－５４２）－ＣＡＤ（３４７－４４８）およびＬＯＶ（４０４－５３９）―ＣＡＤ（３４７－４４８）を導入した細胞においては、光を照射してもＮＦＡＴの核への局在化の効率が悪かった。また、ＬＯＶ（４０４－５３５）―ＣＡＤ（３４７－４４８）を導入した細胞においては、光の照射によってＮＦＡＴが効率よく核へ局在化したものの、光を遮断した状態においてもＮＦＡＴの核への局在化が見られた（図６Ｂ）。

一方、ＬＯＶ（４０４－５３８）―ＣＡＤ（３４７－４４８）を導入した細胞においては、光を遮断した状態ではＮＦＡＴが細胞質中で認められ、光を照射した状態では、ＮＦＡＴが核で認められた（図６ＡおよびＢ）。

[0077] 以上の結果を踏まえ、ＬＯＶ（４０４－５３８）－ＣＡＤ（３４７－４４８）を、Ｏｒａｉ１を光制御できるポリペプチドの候補とした。当該ポリペプチドを以下、ＢＡＣＣＳ（Ｂｌｕｅ　ｌｉｇｈｔ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｃａｌｃｉｕｍ　Ｃｈａｎｎｅｌ　Ｓｗｉｔｃｈ）と呼ぶ。ＢＡＣＣＳのアミノ酸配列では、ＬＯＶ２―Ｊαと ＣＡＤ領域のつなぎ目に位置する「し」が重要な役割を果たしていると思われる。ＬＯＶ２―Ｊαが光スィッチとして機能するためにはこの部位のアミノ酸が疎水性である必要がある（Ｈａｒｐｅｒら、２００４）。つまり、この「し」が、光を遮断した状態において、Ｌ０Ｖ２領域およびＪα領域の構造を安定化させていると考えられている。一方、この「し」は、ＣＡＤ領域が０ｒａｉｌを活性化させる場合においても重要であるため、光照射によりＪα領域がＬＯＶ２領域から離れて「し」が融合タンパク質の表面に露出したときにのみ０ｒａｉｌを活性化することができると推測される。

[0078] （５）カルシウムイメージングによる検証

ＢＡＣＣＳによつて活性化された細胞内カルシゥムシグナルを直接的に観察するために、カルシウムセンサーを使用して以下の手順でカルシウムィメ

ージングを行った。

蛍光タンパク質を組み込まれたＢＡＣＣＳの組み換えベクター（ｐｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳ-ＷＰＲＥまたはｐｍＣｈｅｒｒｙ-ＢＡＣＣＳ-ＷＰＲＥ）、およびＢＡＣＣＳと共に０ｒａｉｌを同時に発現させる組み換えベクター（ｐｔｄＴｏｍａｔｏ—ＢＡＣＣＳ—２Ａ—Ｏｒａｉ１-ＷＰＲＥ）を作製した。ｐｔｄＴｏｍａｔｏ—ＢＡＣＣＳ—２Ａ—Ｏｒａｉ１-ＷＰＲＥは、Ｔｈｏｓｅａ ａｓｉｇｎａ ｖｉｒｕｓ由来の２Ａペプチド（ＦｅＩｉｐｅら、２００６）の２２アミノ酸および０ｒａｉ１をｔｄＴｏｍａｔｏ—ＢＡＣＣＳのＣ末端に融合させた構成となっている。タンパク質への翻訳の際に、２Ａペプチド配列が存在していると、その２Ａペプチドを挟む前後のポリペプチドがつながらずに、２つのポリペプチドとして発現する。すなわち、ｐｔｄＴｏｍａｔｏ—ＢＡＣＣＳ—２Ａ—Ｏｒａｉ１-ＷＰＲＥは１回の翻訳によって、２つの分離したポリペプチド（ｔｄＴｏｍａｔｏ_ＢＡＣＣＳおよび０ｒａｉ１）として発現する。

このように、Ｂ六〇〇３と共に０「ａｉ１を同時に発現できる組み換えベクターによれば、２つのタンパク質の発現を同時に制御できるため、タンパク質発現細胞において発現するＢＡＣＣＳおよび０ｒａｉ１の比を一定にすることができる。

まず、Ｏｒａｉ１-ＹＦＰプラスミドから、組み換えベクター０ｒａｉ１—ｓｔｏｐ ｃｏｄｏｎ—ＳａＩＩ（以下、「ｐＯｒａｉ１_ＳａＩＩ」と呼ぶ）を作製した。

実施例１で作製したｐｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳ-ＷＰＲＥ中の、制限酵素認識部位であるＢｓｐＥＩ_ＳａＩＩサイトで挟まれたＢＡＣＣＳを、ｐ０ｒａｉ１-ＳａＩＩを制限酵素（ＢｓｐＥＩおよびＳａＩＩ）で処理した断片と置き換えて、ｐｔｄＴｏｍａｔｏ—ＢｓｐＥＩ—Ｏｒａｉ１-ＷＰＲＥを作製した。

ｐｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢｓｐＥＩ-０ｒａｉ１—ＷＰＲＥ中のＢｓｐＥＩサイトに、ＢＡＣＣＳおよび２Ａペプチドを融合させたＢｓｐＥＩ-Ｌ０Ｖ

（４０４－５３８）－ＣＡＤ（３４７－４４８）－２Ａ－ＢｓｐＥＩを挿入し、ｐｔｄＴｏｍａｔｏ―ＢＡＣＣＳ―２Ａ―Ｏｒａｉｌ―ＷＰＲＥを作製した。このプラスミド中のｔｄＴｏｍａｔｏを制限酵素（ＡｇｅＩおよびＢｇｌＩＩ）で処理して得られた断片を、赤色蛍光タンパク質レポーターベクターであるｐｍＣｈｅｒｒｙ－Ｃ１ベクターを制限酵素（ＡｇｅＩおよびＢｇｌＩＩ）処理した断片と置き換えることで、組み換えベクターｐＣｈｅｒｒｙ－ＢＡＣＣＳ－２Ａ－０ｒａｉ１―ＷＰＲＥを作製した。

[0079] 当該組み換えベクターをＨＥＫ２９３細胞に遺伝子導入し、ＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ培地中でＢＡＣＣＳと０ｒａｉｌを同時発現させた。遺伝子導入から２４～３６時間後に、青色光（４７０ｎｍ）で発現細胞を刺激し、カルシウムイオン蛍光インジケーターであるＦｌｕｏ＿４またはＲｈｏｄ＿３（インビトロジェン社製）を添加し、カルシウム濃度の変化を観察した（図７Ａ）。観察は５秒間毎のタイムラプスで、コンフォーカル顕微鏡（商品名；ＢｉｏＲａｄ　ＭＲＣ１０２４、バイオ'ラッド　ラボラトリーズ株式会社製）で行った。それぞれの細胞について、ΔＦ（蛍光変化量）／Ｆ０（光刺激前の蛍光強度）を算出し、観察終了時点の値が１になるようにΔＦを基準化し、縦軸にプロットし、横軸に時間（秒）を示した結果を図７Ｂに示す。図７Ｂに示される通り、ＢＡＣＣＳ＿２Ａ＿Ｏｒａｉ１発現細胞において、光の照射によるカルシウム濃度の上昇が認められた。

各組み換えベクターを作製するために使用したプライマーおよび錶型を以下に示す。

[0080]

[表2]

<2Aペプチドの増幅のために使用したプライマー>
T190：5'-GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATC
T191：5'-ACCGGTGATCCCGGTGCGGGGCCGGGATTTTCCTCCACGTCCCCG
鋳型：なし

<2Aペプチド-BspEI の増幅のために使用したプライマー>
T213：5'-TGGCATCCACGAGGGCAGGGGAAGTCTTCT
T215：5'-GAACTTCCGGATGCATGGGGCCGGGA
鋳型：2Aペプチド

<BspEI-L0V (404-538) -CAD (347-448) の増幅のために使用したプライマー>
Tomato- C2：5'-ACCACCTGTTCCTGTACGGC
T212：5'-CCCTGCCCTCGTGGATGCCAGGGTTGTTGAC
鋳型：ptdTomato-LOV (404-538) -CAD (347-448)

<BspEI-L0V (404-538) -CAD (347-448) _2A-BspEI の増幅のために使用したプライマー>
Tomato-C2：5,-ACCACCTGTTCCTGTACGGC
T215：5'-GAACTTCCGGATGCATGGGGCCGGGA
鋳型：BspEI-LOV (404-538) -CAD (347-448) および2Aペプチド-BspEI

[0081] (実施例2：0rai1とBACCSとのポリペプチドの作製)

BACCSは、内在性の0raiIが発現した場合、または0rai1遺伝子と共発現した場合等に、カルシウムイオンチャネル0raiIを光依存的に開閉することができる。そこで、0rai1とBACCSを結合させ、単一のポリペプチドとして発現させることによって、カルシウム流入を制御できるポリペプチドを作製した。0「ai1と○八Dは1：2の比で存在する場合に最も効率よく0rai1を活性化させることができ、0rai1のC末端にCADをタンデムに2つつなげた場合に0raiIが構成的に活性化されることが報告されている (Liら、2010)。そこで、0rai1のC末端にBACCSを2つタンデムにつなげた組み換えベクターを以下の手順で作製した。

[0082] (1) pOrai1-tdTomato-BACCSx2-WPREの作製

翻訳効率を上げるために0rai1_YFPの開始コドンの5'末端側にkozak様配列 (CCACC) を挿入した。具体的には、当該プラスミド中の0rai1-YFP中の制限酵素認識部位であるBglII-BspE

Iサイトに、制限酵素（XhoI）認識部位およびKozak配列（以下、「KZK」と略す）を有する下記のリンカーを挿入した。

[0083] [表3]

T188：δ'-GATCCTCGAGCCACCATGCAT
T189：δ'-CCGGATGCATGGTGGCTCGAG

[0084] また、並行して、実施例1と同様に、組み換えベクターptdTomato-BACCS-WPREを作製し、その制限酵素認識部位であるNheI-AgeIサイトに、制限酵素（XhoI）認識部位を有する下記のリンカーを挿入し、組み換えベクター（pXhoI-AgeI-tdTomato—BACCS—WPRE）を作製した。

[0085] [表4]

T202：5'-CTAGCGCTCTCGAGGAATTCA
T203：5'-CCGGTGAATTCCTCGAGAGCG

[0086] pKZK-0rai1-YFPを制限酵素（XhoIおよびAgeI）によって処理し、得られたDNA断片を、pXhoI-AgeI_tdTomato—BACCS—WPRE中のXhoI-AgeIサイトに挿入し、組み換えベクター（pKZK—Orai1-tdTomato-BACCS-WPRE）を作製した。

当該組み換えベクター中の0rai1とtdTomatoとの間には、0rai1-YFPに由来する、制限酵素認識部位であるEcoRI_AgeIサイトを有するリンカーが含まれるが、当該制限酵素認識部位を除去する目的で、このEcoRI—AgeIサイトを下記の配列に置き換えた。得られた組み換えベクター（pKZK_Orai1—1inker2-tdTomato-BACCS-WPRE）のアミノ酸配列は変化していない。

[0087] [表5]

T226：5'-AATTCTCCAGTCCACGGTGCCACGGGCCAGAGATCCA
T227：5'-CCGGTGGATCTCTGGCCCGTGGCACCGTGGACTGGAG

[0088] 下記のプライマーおよび鋳型を使用して、PCRサーマルサイクラーによ

つて増幅した。得られたＰＣＲ産物（ＢｇｌＩＩ-ＢａｍＨＩ断片）を、ｐＫＺＫ-０ｒａｉ１-ＩｉｎｋｅｒＺ-ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳ-ＷＰＲＥ中のｔｄＴｏｍａｔｏとＢＡＣＣＳの間の制限酵素認識部位であるＢｇｌＩＩサイトに挿入し、組み換えベクター（ｐＫＺＫ＿Ｏｒａｉ１＿ＩｉｎｋｅｒＺ-ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳ-Ｌ１-ＢＡＣＣＳ-ＷＰＲＥ、以下「ｐＯｒａｉ１＿ｔｄＴｏｍａｔｏ＿ＢＡＣＣＳｘ２＿ＷＰＲＥ」と呼ぶ）を作製した。「Ｌ１」はＬｉら（２０１０）が作製した０ｒａｉｌ—Ｌ２-ＣＡＤ（３３６-４８５）-Ｌ１-ＣＡＤ（３３６-４８５）中の「Ｌ１」のアミノ酸配列を参考にした。

[0089] [表６]

＜Ｌ１（25アミノ酸リンカー配列)のPCR増幅のために使用したプライマー〉
T228：5'-GGAGGGTCAGGAGGAAGTGGAGGAGGTATCCTGCAGTCTCGGGGTG
T229：δ'-TCCAGAACCGCCTGAACCACCACTGCCACCCCGAGACTGCAGGATA
踌型：なし

＜LI-BamHI のPCR増幅のために使用したプライマー＞
T23 1：5'-TGGCATCCACGGAGGGTCAGGAGGAAGTGG
T232：5'-GGACTTGGATCCAGAACCGCCTGAACCACCAC
铸型：L１

＜Bgl II-BACCS のPCR増幅のために使用したプライマー＞
Tomato-C2：5'-ACCACCTGTTCCTGTACGGC
T230：δ'-CTGACCCTCCGTGGATGCCAGGGTTGTTGA
铸型：ptdTomato-BACCS-WPRE

＜BglII-BACCS-LI-BamHI のPCR増幅のために使用したプライマー＞
Tomato-C2：5'-ACCACCTGTTCCTGTACGGC
T232：5'-GGACTTGGATCCAGAACCGCCTGAACCACCAC
铸型：Bgl II-BACCSおよびLI-BamHI

[0090] （２）ｐＯｒａｉ１-Ｃｈｅｒｒｙ-ＢＡＣＣＳｘ２-ＷＰＲＥ、ｐ０ｒａｉ１-ＹＦＰ-ＢＡＣＣＳＸ２-ＷＰＲＥおよびｐ０ｒａｉ１-ＢＡＣＣＳＸ２-ＷＰＲＥの作製

ｐ０ｒａｉ１-ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳｘ２-ＷＰＲＥを制限酵素（ＡｇｅＩおよびＢｇｉＩＩ）で処理して得られたｔｄＴｏｍａｔｏ部分を、蛍光タンパク質融合発現ベクターｐｍＣｈｅｒｒｙ-Ｃ１を制限酵素（A

ｇｅｌおよびＢｇｌＩＩ）で処理して得られた断片と置き換えて、組み換えベクター（ｐＯｒａｉ１-Ｃｈｅｒｒｙ-ＢＡＣＣＳＸ２-ＷＰＲＥ）を作製した。また、ｐＯｒａｉ１-ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳｘ２-ＷＰＲＥ中のｔｄＴｏｍａｔｏ（Ａｇｅｌ_Ｂ$_{g}$ＩＩＩ断片）を、黄色蛍光タンパク質発現ベクターＰＥＹＦＰ—Ｃ１のＡｇｅｌ-ＢｇＩＩＩと置き換えて、組み換えベクター（ｐＯｒａｉ１-ＹＦＰ-ＢＡＣＣＳＸ２-ＷＰＲＥ）を作製した。また、ｐＯｒａｉ１-ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳｘ２-ＷＰＲＥ中のｔｄＴｏｍａｔｏ（Ａｇｅｌ-ＢｇＩＩＩ断片）を、下記リンカーと置き換えて、組み換えベクター（ｐＯｒａｉ１-ＢＡＣＣＳＸ２-ＷＰＲＥ）を作製した。

[0091] [表７]

T233 : 5' - CCGGTCGGAGGAAGCGGTG
T234 : δ' - GATCCACCGCTTCCTCCGA

[0092] （３）ｐＯｒａｉ１-ＨＡ-ＢＡＣＣＳＸ２-ＷＰＲＥの作製

下記のプライマーおよび錶型を使用して、ＰＣＲサーマルサイクラーによって増幅した。得られたＰＣＲ産物（３ｘＨＡタグ配列）を、ｐＯｒａｉ１-ＢＡＣＣＳＸ２-ＷＰＲＥ中の制限酵素認識部位であるＡｇｅｌサイトに挿入し、組み換えベクター（ｐＯｒａｉ１-ＨＡ-ＢＡＣＣＳＸ２-ＷＰＲＥ）を作製した。

[0093] [表８]

< 3xHA 断片の増幅のために使用したプライマー >
T001 : 5' - GGATACCCCTATGACGTTCCAGATTATGCTGGAAGCTATCCATACGATGTCCCCGACTAC
T002 : 5' - TCCGGCATAGTCTGGCACATCGTAGGGATAGGAGCCAGCGTAGTCGGGGACATCGTATGG
铸型 : なし
< AgeI-3xHA-AgeI 断片の増幅のために使用したプライマー >
T236 : 5' - GATCCACCGGTCGGAGGATACCCCTATGACGTTC
T237 : 5' - CTCCGACCGGTGGGGCATAGTCTGGCACATCGTAG
铸型 : 3xHA

[0094] （４）ｐ０ｒａｉ１-ＨＡ-ＢＡＣＣＳＸ２-ｉｇＹ_ＷＰＲＥ、およびｐ０ｒａｉ１-ＨＡ-ＢＡＣＣＳＸ２-ｉｍＴｍ-ＷＰＲＥの作製

ｐ０ｒａｉ１_ＨＡ_ＢＡＣＣＳＸ２_ＷＰＲＥ発現細胞を蛍光により可

視化するために、ＩＲＥＳ―ｇａｐＹＦＰ（Ｉｍａｉら、２００６；以下、「ｉ９Ｙ」と略す）またはＩＲＥＳ－ｍｅｍｂｒａｎｅ-ｔｄＴｏｍａｔｏ-ｍｙｃ（Ｍｕｚｕｍｄａｒら、２００７；以下、「ｉｍＴｍ」と略す）を、ｐＯｒａｉ１_ＨＡ_ＢＡＣＣＳｘ２_ＷＰＲＥの3'非翻訳領域の制限酵素認識部位であるＳａＩＩサイトに挿入し、組み換えベクター(それぞれ、ｐＯｒａｉ１-ＨＡ-ＢＡＣＣＳｘ２-ｉｇＹ-ＷＰＲＥ、ｐＯｒａｉ１-ＨＡ-ＢＡＣＣＳＸ２-ｉｍＴｍ-ＷＰＲＥ）を作製した。なお、ＩＲＥＳ（ｉｎｔｅｒｎａｌ ｒｉｂｏｓｏｍｅ ｅｎｔｒｙ ｓｉｔｅ）配列は、メッセンジャーＲＮＡの途中から翻訳を開始させることができる配列である。例えば、Ｏｒａｉ１-ＨＡ-ＢＡＣＣＳＸ２-ｉｇＹのメッセンジャーＲＮＡからは、Ｏｒａｉ１―ＨＡ－ＢＡＣＣＳＸ２とｇａｐＹＦＰという、２つのポリペプチドが翻訳される。

上記組み換えベクターによる発現産物は、Ｏｒａｉ１とＢＡＣＣＳの間に、２１アミノ酸リンカー(Ｏｒａｉｌ―ＢＡＣＣＳＸ２）、５７アミノ酸リンカー(Ｏｒａｉ１―ＨＡ－ＢＡＣＣＳＸ２）、２５８アミノ酸リンカー（Ｏｒａｉ１―ｍＣｈｅｒｒｙ-ＢＡＣＣＳ２）、４９８アミノ酸リンカー（Ｏｒａｉ１―ｔｄＴｏｍａｔｏ－ＢＡＣＣＳＸ２）、２６１アミノ酸リンカー（Ｏｒａｉ１―ＹＦＰ－ＢＡＣＣＳＸ２）のいずれかが挿入されたコンストラクトとなる。

いずれにおいても、４７０ｎｍの光(青色光）の照射によって、効率よくカルシウム濃度が上昇した(図８Ｂ、略記はそれぞれ、Ｃｈｅ；Ｏｒａｉ１-ｍＣｈｅｒｒｙ-ＢＡＣＣＳｘ２、Ｔ；Ｏｒａｉ１-ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳＸ２、ＨＡ；Ｏｒａｉ１-ＨＡ-ＢＡＣＣＳＸ２-ｉｍＴｍ、を示す）。なお、カルシウム濃度の変化は実施例１と同様に算出した。また、Ｏｒａｉ１-ｍＣｈｅｒｒｙ_ＢＡＣＣＳｘ２をＨＥＫ２９３細胞中で発現させ、４７０ｎｍの光(青色光）を試験期間中継続して照射した後の、カルシウム蛍光プローブであるＦｌｕｏ_４を使用したカルシウムイメージング結果を図８Ａに示す。

０ｒａｉ１とＢＡＣＣＳの間のリンカーの長さに関して、本実験により、最短で２１アミノ酸で機能することが確認された。さらに、光の照射および遮断を繰り返すことで、カルシウムチャネルの開閉を制御できることを確認した (図８Ｃ)。

[0095] (実施例３ :０ｒａｉ１に結合させるＢＡＣＣＳの数の検討)

０「ａｉ１と○六0は１ :２の比で存在する場合に０ｒａｉｌを効率よく活性化させることができるという報告がある (Ｌｉら、２０１０)。そこで、０ｒａｉ１とＣＡＤの比が０ｒａｉｌ_ＢＡＣＣＳの作用に与える影響を検証すべく、ＯｒａｉｌにＢＡＣＣＳを１つだけ結合したポリペプチドを作製し、実施例１(４)同様に、ＮＦＡＴを使用した核移行アツセィを行った。

実施例２(１)の中で作製したｐＫＺＫ_Ｏｒａｉ１_ｔｄＴｏｍａｔｏ—ＢＡＣＣＳＸ１—ＷＰＲＥを、ＯｒａｉｌにＢＡＣＣＳを１つだけ結合したポリペプチド (Ｏｒａｉ１-ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳＸ１) として使用した。

核移行シグナルを検出するためのレポーター遺伝子ＮＦＡＴ-ＧＦＰから、制限酵素 (ＡｇｅＩおよびＳａｃＩ) でＮＦＡＴを切り出し、これを蛍光タンパク質発現ベクター—ｐＥＹＦＰ-Ｎ１の制限酵素認識部位であるＡｇｅＩ-ＳａｃＩサイトに挿入し、組み換えベクター (ＮＦＡＴ—ＹＦＰ) を作製した。

０ｒａｉ１-ｔｄＴｏｍａｔｏ-ＢＡＣＣＳＸ１およびＮＦＡＴ-ＹＦＰを、ＨＥＫ２９３細胞中で共発現させ、４７０ｎｍの光 (青色光)を２０分間照射した。その結果、ＮＦＡＴ—ＹＦＰの蛍光 (図９Ａ中「ＮＦＡＴ_ＹＦＰ」)は細胞質中にのみ認められ、核において観察されず、ＮＦＡＴの核移行が認められなかった。つまり、Ｏｒａｉ１にＢＡＣＣＳを１つしか結合していないポリペプチドによる０ｒａｉｌの活性化は困難であることが示された。

対照実験として、Ｏｒａｉ１_ｔｄＴｏｍａｔｏ_ＢＡＣＣＳｘ２、ＮＦ

ＡＴ―ＧＦＰをＨＥＫ２９３細胞中で共発現させた。４７０ｎｍの光を２０分間照射することでＮＦＡＴは核に移行した（図９Ｂ中「ＮＦＡＴ＿ＧＦＰ」）。

[0096] （実施例４：０ｒａｉ１の変異体を使用したＢＡＣＣＳの光応答の検討）

ＣＡＤ領域による０ｒａｉｌの活性化が抑制される０ｒａｉｌの変異（０ｒａｉ１（Ｌ２７３Ｄ））を、Ｏｒａｉ１-ＣＡＤ-ＣＡＤ（０ｒａｉ１のＣ末端にＣＡＤをタンデムに２つつなげたコンストラクトによって構成的に活性化されている）に導入すると、構成的なカルシウムの流入は観察されなし（Ｌｉら、２０１０）。

そこで、０ｒａｉ１に不活性型変異Ｌ２７３Ｄをリコンビナント PＣＲによって導入し、さらにＨＡタグおよび蛍光物質を組んだ組み換えベクター（Ｏｒａｉ１（Ｌ２７３Ｄ）-ＨＡ-ＢＡＣＣＳＸ２-ｉｇＹ）を作製した（図１ＯＡ）。これをＨＥＫ２９３細胞に導入してカルシウムシグナルを観察した。

０ｒａｉ１（Ｌ２７３Ｄ）―ＨＡ―ＢＡＣＣＳＸ２に４７０ｎｍの光（青色光）を照射する前、および１０分間照射した後の、赤色蛍光カルシウムセンサーであるＲｈｏｄ―3によるカルシウムイメージング結果を、図１０Ｂに示す。図１０Ｂに示される通り、光の照射の前後で細胞内カルシウム濃度に変化は認められなかった。

また、ＢＡＣＣＳのＬＯＶ２―Ｊαを暗変異体にしたポリペプチド（Ｏｒａｉ１-ＨＡ-ＢＡＣＣＳ（ｄａｒｋ）Ｘ２）を作製した。０ｒａｉ１―ＨＡ-ＢＡＣＣＳ（ｄａｒｋ）Ｘ２を発現するＨＥＫ２９３細胞に４７０ｎｍの光（青色光）を照射しても、細胞内のカルシウム濃度の上昇は認められなかった（データは示していない）。

以上から、ＢＡＣＣＳが光に応答して０ｒａｉ１に作用し、Ｏｒａｉｌを活性化させることが示された。

[0097] （実施例５：ＣＤＩ領域を含む０ｒａｉｌ＿ＢＡＣＣＳについての検討）

ＳＴＩＭ１のＣＤＩ（Ｃａｌｃｉｕｍ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｉｎａｃｔ

ｉｖａｔｉｏｎ）（アミノ酸４７０＿４９１位）領域は、Ｏｒａｉ１を素早く不活性化するのに必要な領域を含む（Ｍｕｌｌｉｎｓら、２００９）。そのため、Ｏｒａｉ１―ＢＡＣＣＳにＣＤＩ領域を組み込むことによって、一旦活性化されたＯｒａｉｌをすぐに不活性化できるカルシウムチャネルが得られる可能性がある。

そこで、ＣＤＩ領域を含むようにＯｒａｉｌ―ＢＡＣＣＳにおけるＣＡＤ領域のＣ末端を伸長し（伸長されたＣＡＤ領域を「ＣＡＤ（３４７-６３０）」と示す）、これにＨＡタグおよび蛍光物質が組み込まれた組み換えベクター（Ｏｒａｉ１―ＨＡ―ＢＡＣＣＳ（３４７-６３０）ｘ２-ｉｇＹ；図１１Ａ）を作製した。ＣＡＤ（３４７-６３０）のＤＮＡ断片は、プラスミドＳＴＩＭ１＿ＣＦＰからＰＣＲによって増幅し、上記実施例１と同様の手順でＢＡＣＣＳ（３４７-６３０）を作製した。

これらの組み換えベクターをＨＥＫ２９３細胞中で発現させ、当該細胞に４７０ｎｍの光（青色光）を照射し、赤色蛍光カルシウムセンサーであるＲｈｏｄ-３を使用したカルシウムイメージングを行った。測定開始５０秒後から１０分間４７０ｎｍの光（青色光）を照射し、その後１５分間、暗条件で観察した。

その結果、Ｏｒａｉ１―ＨＡ―ＢＡＣＣＳ（３４７-６３０）ｘ２-ｉｇＹにおいては光の照射によって細胞内カルシウムの濃度が上昇した。しかし、その後、予想に反してカルシウムの濃度の減少（すなわち、Ｏｒａｉ１の不活性化）がすぐに認められることはなく、光を遮断しても、細胞内カルシウム濃度が低下しなかった（図１１Ｂ、略記はそれぞれ、ＷＴ；ＣＤＩ領域を含まないＯｒａｉ１＿ＢＡＣＣＳ、ＣＤＩ；ＣＤＩ領域を含むＯｒａｉｌ-ＢＡＣＣＳ、を示す）。なお、カルシウム濃度の変化は実施例１と同様に算出した。この結果は、Ｏｒａｉ１＿ＢＡＣＣＳにＣＤＩ領域を導入することは適切ではなく、また、Ｏｒａｉ１―ＢＡＣＣＳを構成するＣＡＤ領域のＣ末端側の配列の長さがＯｒａｉｌ―ＢＡＣＣＳの作用において重要であることを示唆している。

[0098] ＬＯＶ２＿Ｊα内のＧ５２８Ａ変異およびＮ５３８Ｅ変異の2重変異（ＧＶＭＬＩＫＫＴＡＥＮからＡＶＭＬＩＫＫＴＡＥＥ）によって、ＬＯＶ２の光スィツチとしてのダイナミックレンジが大きくなることが報告されている（Ｓｔｒｉｃｋｌａｎｄら、２０１０）。このような2重変異をＮＦＡＴアッセィに使用した4つの野生型ＬＯＶ（４０４―５４２、４０４―５３９、４０４―５３８、４０４－５３５）に導入し、４７０ｎｍの光を照射した。その結果、いずれのコンストラクトにおいてもＮＦＡＴが核へ移行せず、光スィッチがオンにならなかった（データは示していない）。

[0099] （実施例６：ＢＡＣＣＳＸ２の作製）

０ｒａｉ１発現ベクターを使用せずに、ＢＡＣＣＳＸ２が単独でどの程度０ｒａｉ１を活性化できるかを調べるために、ＢＡＣＣＳを2つタンデムにつなげた組み換えベクターを以下の手順で作製した。本例では、ＨＥＫ２９３Ｔで発現している内在性の０ｒａｉ１に対してＢＡＣＣＳＸ２が及ぼす影響を検討した。

[01 00] （１）口B 八〇〇3 ズ2＿ＷＰ卜¾ 巳の作製

下記のプライマーおよび錶型を使用して、ＰＣＲサーマルサイクラーによつて増幅した。得られたＰＣＲ産物（Ａｇｅ Ｉ－ ＢａｍＨ Ｉ断片とＢａｍＨ１－ ＳａＩＩ断片）を、ｐＯｒａｉ１＿ＨＡ＿ＢＡＣＣＳｘ２＿ＷＰＲＥ改変ベクター（インサートの開始コドン近傍の配列を、下記リンカーでＮｈｅＩ－ＸｈｏＩ＿ＫＺＫ＿開始コドン―ＡｇｅＩに改変したもの）のＡｇｅＩ－ＳａＩＩ断片を除いたベクターに挿入し、組み換えベクター（ｐＢＡＣＣＳＸ２―ＷＰＲＥ）を作製した（図１２Ａ）。

上記組み換えベクターによる発現産物は、実施例2におけるｐＯｒａｉ１－ＨＡ－ＢＡＣＣＳＸ２－ＷＰＲＥ発現産物中のＢＡＣＣＳＸ２の領域と同一のアミノ酸配列を有し、かつ、Ｎ末端に１０アミノ酸（ＭＧＰＶＧＧＳＧＧＳ）、Ｃ末端に9アミノ酸（ＧＧＳＧＧＳＧＬＶ）が付加されている。これらは融合タンパク質を作製する際にリンカーとして利用できるように付加したものである。

[0101] [表9]

<Nhel-BACCS-BamHI 断片の増幅のために使用したプライマー>
T139: TAAGACCGACCGACAGTTCC
T290: TCCTCCGGATCCTCCGTGGATGCCAGGGTT
鋳型 :Omil.HA-BACC Sx2

<BamHTBACCS- SalI 断片の増幅のために使用したプライマー>
T267: GTGGGAGGATCGGGAGGAAGTGGAGGAGGTATC
T291:GTCAGAGTCGACTTAGACTAGTCCGCTACCTCCAGAGCCGCCGTGGATGCCAGGGTTGT
TGAC
鋸型 :Orail·HA-BACCSx2

<Nhel-XhoI-KZK- 開始コドン-AgeI リンカー>
T32i: CTAGCCTCGAGGGCACCATGGGA
T322: CCGGTCCCATGGTGGCCTCGAGG

[0102] (2) pBACCSx2_igY—WPREの作製

上記で得られたpBACCSx2_WPRE発現細胞を蛍光により可視化するために、実施例2と同様に、igYを、pBACCSX2—WPREの3'非翻訳領域の制限酵素認識部位であるSalIサイトに挿入し、組み換えベクター (PBACCSX2—igY-WPRE) を作製した。

BACCSX2-igYを発現するHEK293T細胞に対してカルシウムイメージングを行った。カルシウム蛍光プローブとしてRhod_3 (赤色蛍光カルシウムセンサー) を用いた。観察開始50秒後から、コンフオーカル顕微鏡の442nmの波長のレーザーを5秒毎に照射して細胞を刺激した後、それぞれの細胞について、蛍光強度変化を検討した。各時点での蛍光強度として、ムF (蛍光変化量)/ F0 (光刺激前の蛍光強度) を算出した。AF/F0の値を縦軸にプロットし、横軸に時間 (秒) を示した結果を図12Bに示す。比較試験としてOrai1-HA-BACCSX2-igYを発現するHEK293T細胞で同様にカルシウムイメージングを行った。なお、図中のBX2はBACCSx2_igY (解析細胞数η=45) を、OBX2はOrai1-HA-BACCSX2-igY (解析細胞数η=35) を示す。各時点のAF/FOは、各細胞についての平均値として標準誤差と共に示した。青色光照射開始時に認められる、わずかな蛍光強度の上昇

は、測定機器によるノイズである。

図１２Ｂに示される通り、ＢＡＣＣＳＸ２はＯｒａｉｌ発現ベクターを使用しなくとも内在性の０ｒａｉｌを活性化でき、Ｏｒａｉ１- ＨＡ- ＢＡＣＣＳＸ２よりも効率よくカルシウム濃度を上昇させることが認められた。

[01 03] （３）ｐＹＦＰ—ＢＡＣＣＳＸ２—ＷＰＲＥの作製

ＢＡＣＣＳＸ２のＮ末端に蛍光タンパク質を融合できることを確認するために、下記のプライマーおよび錶型を使用して、ＰＣＲサーマルサイクラーによって増幅した。得られたＰＣＲ産物 (ＮｈｅＩ- ＡｇｅＩ断片）をｐＢＡＣＣＳＸ２—ＷＰＲＥのＮｈｅＩ＿ＡｇｅＩサイトに挿入し、組み換えベクター (ｐＹＦＰ—ＢＡＣＣＳＸ２—ＷＰＲＥ）を作製した。ＹＦＰ—ＢＡＣＣＳＸ２を発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞に対してカルシウムイメージングを行った。併せて、ＢＡＣＣＳＸ２—ｉｇＹを発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞に対してもカルシウムィメージングを行った。カルシゥム蛍光プローブとしてＲｈｏｄ＿３ (赤色蛍光カルシウムセンサー）を用いた。観察開始５０秒後から、４７０ｎｍ波長のＬＥＤランプを継続的に照射して細胞を刺激した。それぞれの細胞について、上記同様にＡＦ／Ｆ０を算出して縦軸にプロットし、横軸に時間 (秒）を示した結果を図１３に示す。なお、図中のＢＸ２はＢＡＣＣＳＸ２—ｉｇＹ (解析細胞数η＝５）を、ＹＢＸ２はＹＦＰ—ＢＡＣＣＳＸ２ (解析細胞数η＝５）を示す。各時点のＡＦ／ＦＯは、各細胞についての平均値として標準誤差と共に示した。

図１３に示される通り、Ｎ末端へタンパク質を融合しても、ＢＡＣＣＳＸ２は内在性の０ｒａｉｌを活性化でき、効率よくカルシウム濃度を上昇できることが認められた。

[01 04] [表10]

<NherYFP-AgeI　断片の増幅のために使用したプライマー>
T28i: AGGTGGAGATCTGCTAGCGCCAC　CATGGTGAGCAAGGG
T282: TCCACCGACC　GGTCCCTTGTACAGCTCGTCGATGC
錶型 :EYFP

[01 05] ＳＴＩＭ１はＳＴＩＭ２との配列類似性が高く、線虫、ヒト等の様々な種

間で保存されている (図２Ｂ；Ｙｕａｎら、２００９より改変)。図２Ｂの略記はそれぞれ、Ｈ．ｓａｐ；ヒト、Ｂ．ｔａｕ；ウシ、Ｐ．ｔｒｏ；チンパンジー、Ｅ．ｃａｂ；ウマ、Ｇ．ｇａｌ；ニワトリ、Ｍ．ｍｕｓ；マウス、Ｒ．ｎｏｒ；ラット、Ｓ．ｓｃｒ；ブタ、Ｘ．ｌａｅ；アフリカツメガエル、Ｄ．ｒｅｒ；ゼブラフィッシュ、Ｄ．ｍｅｌ；ショウジョウバエ、Ａ．ｇａｍ；蚊、Ｎ．ｖｉｔ；宝石バチ、Ｃ．ｅｌｅ；線虫、を示す。

[01 06] 同様に、０ｒａｉ１は０ｒａｉ２および０ｒａｉ３との配列類似性が高く、線虫、ヒト等の様々な種間で保存されている (図２Ａ)。図２Ａの略記はそれぞれ、ｈ；ヒト、ｍ；マウス、ｚ；ゼブラフィッシュ、Ｘ；アフリカツメガエル、ｄ；ショウジョウバエ、ｃｅ；線虫、を示す。

[01 07] また、Ｊα領域も、様々な植物種で高度に保存されている (図３)。図３の略記はそれぞれ、Ｏｓ；イネ フォトトロピン１、Ｚｍ；トウモロコシ フォトトロピン１、Ａｔ；シロイヌナズナ フォトトロピン１およびフォトトロピン２、Ｐｓ；エンドウマメ フォトトロピン１、Ｖｆ；ソラマメ フオトトロピン１、Ａｃ；ホウライシダ フィトクロム３、Ａｓ；オートムギ フォトトロピン１、を示す (Ｈａｒｐｅｒら、２００４より引用)。

[01 08] さらに、ＬＯＶ２領域も、前述のように多くの植物間で保存されており、例えば、オートムギのＬＯＶ２領域のアミノ酸配列との相同性は、アジアイネのフォトトロピン１；８１％、シロイヌナズナのフオトトロピン１；８７％、シロイヌナズナのフオトトロピン２；８３％、エンドウマメのフォトトロピン１；８７％、ソラマメのフオトトロピン１；トウモロコシのフオトトロピン１；９５％、トマトのフオトトロピン１；８７％である。

[01 09] これらのことから、各領域は、様々な種のホモログで代用できる可能性がある。

[01 10] 以下に、本実施例で使用したプラスミドのコンストラクトを示す。

[01 11]

[表11]

1. tdTomato-aCCS ロマンドラゴン

tdTomato
LOV(404-538)
CAD(347-448)

MVSKGEEVIKEFMRFKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFA
WDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGLVTVTQDSSLQD
GTLIYKVKMRGTNFPPDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHQALKLKDGGH
YLVEFKTIYMAKKPVQLPGYYYVDTKLDITSHNEDYTIVEQYERSEGRHHLFLGHGTGS
TGSGSSGTASSEDNNMAVIKEFMREKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLK
VTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGLV
TVTQDSSLQDGTLIYKVKMRGTNFPPDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHQ
ALKLKDGGRYLVEFKTIYMAKKPVQLPGYYYVDTKLDITSHNEDYTIVEQYERSEGRHH
LFLYGMDELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNC
RFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTYQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYF
IGVQLDGTEHVRDAAERGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLV
AKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEI
LCGFQIVNNPGIH

[0112] [表12]

2. tdTomato-BACCS-2 -orai1 タンパク質

tdTomato
BACCS
zA
Orai1

MVSKGEEVIKEFMRFKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFA
WDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGLVTVTQDSSLQD
GTLIYKVKMRGTNFPPDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHQALKLKDGGH
YLVEFKTIYMAKKPVQLPGYYYVDTKLDITSHNEDYTIVEQYERSEGRHHLFLGHGTGS
TGSGSSGTASSEDNNMAVIKEFMREKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLK
VTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGLV
TVTQDSSLQDGTLIYKVKMRGTNFPPDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKGEIHQ
ALKLKDGGRYLVEFKTIYMAKKPVQLPGYYYVDTKLDITSHNEDYTIVEQYERSEGRHH
LFLYGMDELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNC
RFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTYQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYF
IGVQLDGTEHVRDAAERGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLV
AKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEI
LCGFQIVNNPGIHEGRGSLLTCGDVEENPGPMHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRR
RSGDGEPP QPPP ゆSAVェYP 觀IGQQYSE 風SLNEHS 蘭AL まRKLYLSRAKLKASSRT
SALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPGLLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSN
VHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAFSTVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTS
KPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIASTTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNE
LAEFARLQDQLDH%GDH PLTPG SHY ^

[0 ま 3]

[表13]

3. mCherry-BACCS-2A-Orai1 のコンストラクト

mCherry

BACCS

2A

Orai1

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGP
LPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDS
SLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLKD
DGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGM
DELYKSGLRSLATLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQG
ETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQL
DGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEG
AEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGF
QIVNNPGIHEGRGSLLTCGDVEENPGPMHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSG
SGGEGQAPPGAPPPSAVTYPDWIGQSYSE
VMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPGL
LIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAFST
VIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIASTT
IMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGSHYA
RILQSTVPRARDPPVGGSGGSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEIL
GRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKG
DVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAE
KQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHR
WQQIEILCGFQIVNNPGIHGGSGGSGGGILQSRGGSGGSGGSGSLATTLERIEKNFVITDPR
LPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYT
KSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQK
WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHK
ILIAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIH

[0115]

[0114] [表14]

4. Orai1-BACCS×2のコンストラクト

Orai1

Linker2

BACCS

2A

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYSE
VMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPGL
LIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAFST
VIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIASTT
IMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGSHYA
RILQSTVPRARDPPVGGSGGSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEIL
GRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKG
DVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAE
KQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHR
WQQIEILCGFQIVNNPGIHGGSGGSGGGILQSRGGSGGSGGSGSLATTLERIEKNFVITDPR
LPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYT
KSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQK
WLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHK
ILIAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIH

[表 15]

5. Orail-Cheny-BACCS ×2 のコンストラクト

Orai1
Linker2
Cherry
BACCS
L_I

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYS
EVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPG
LLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAF
STVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPG QPRPTSKPPASG AAANVSTSGITPG^ AAAIA
STTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGS
HYARILQSTVPRARDPPVATMVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGE
GRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKW
ERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEASSERM
YPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDY
TIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQL
TEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQ
PMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYY
NIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTA
ALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIHGGSGGSGGGILQSRGGSGGSGGSGSLATTLERIE
KNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTE
VTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIK
KTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHS
SSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIH

[0116]

[卿]

6' O ai-YFp-BACCS×Z ゆコンヌトラクト

Orail
Lm ψ
ŸF p
BACCS
LL

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYS
EVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPG
LLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAF
STVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIA
STTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGS
HYARILQSTVPRARDPPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDAT
YGKKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQER
TIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMAD
KQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEK
RDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFL
QLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLF
HLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVE
VQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQAL
SEVTAALRERLHRWQQIELLCGFQIVNNPGIHGGSGGSGGGILQSRGGSGGSGGSGSLAT
TLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRD
AIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAE
REGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTL
FGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIELLCGFQIVNNPGIH

[0117]

[表 17]

7. Orail-HA-BACCS X 2 のコンス トラク ト

Orai 1
Linker2
HA
BACCS
L I

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYS
EVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPG
LLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAF
STVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIA
STTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPGS
HYARILQSTVPRARDPPVGGYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAPPVGGSG
GSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVR
KIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRD
AAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKR
NTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPG
IHGGSGGSGGGILQSRGGSGGSGGSGSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTE
YSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPM
RDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIK
KQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALR
ERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIH

[01 18] [表 18]

8. Orai 1-mCherry-BACCS のコンス トラタ ト
Orai I
Linker2
mCherrv
BACCS

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYS
EVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPPG
LLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWAF
STVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIA
STTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFOELNELAEFARLODQLDHRGDHPLTPGS
HYARILQSTVPRARDPPVATMVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGE
GRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKW
ERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQKKTMGWEASSERM
YPEDGALKGEIKQRLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDY
TIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQL
TEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQ
PMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYY
NI巡 QNAE¾¾LY羞 ₑGAEKIKKKRNTLFQTFHVAHSSSLDIO 腿 LTAKQALSEVTA
ALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIH

[01 19]

[表19]

9. Orai1-tdTomato-BACCS のコンストラクト
Orai1
Linker2
tdTomato
BACCS

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSYS
EVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYPP
GLLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELAWA
FSTVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAI
ASTTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDHPLTPG
SHYARILQSTVPRARDPPVATMVSKGEEVIKEFMRFKVRMEGSMNGHEFEIEGEGEGRP
YEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWER
VMNFEDGGLVTVTQDSSLQDGTLIYKVKMRGTNFPPDGPVMQKKTMGWEASTERLYP
RDGVLKGEIHQALKLKDGGHYLVEFKTIYMAKKPVQLPGYYYVDTKLDITSHNEDYTI
VEQYERSEGRHHLFLGHGTGSTGSGSSGTASSEDNNMAVIKEFMRFKVRMEGSMNGH
EFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKK
LSFPEGFKWERVMNFEDGGLVTVTQDSSLQDGTLIYKVKMRGTNFPPDGPVMQKKTM
GWEASTERLYPRDGVLKGEIHQALKLKDGGRYLVEFKTIYMAKKPVQLPGYYYVDTKL
DITSHNEDYTIVEQYERSEGRHHLFLYGMDELYKSGLRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDN
PIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSG
KKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQ
LTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILT
AYEQALSETVTALLTPEEMQQHEITFHFQIVNNPGIH

[0120] [表20]

10. Orai1-BACCS のコンストラクト
Orai1
BACCS

MHPEPAPPPSRSSPELPPSGGSTTSGSRRSRRRSGDGEPPGAPPPPPSAVTYPDWIGQSY
SEVMSLNEHSMQALSWRKLYLSRAKLKASSRTSALLSGFAMVAMVEVQLDADHDYP
PGLLIAFSACTTVLVAVHLFALMISTCILPNIEAVSNVHNLNSVKESPHERMHRHIELA
WAFSTVIGTLLFLAEVVLLCWVKFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQ
AAAIASTTIMVPFGLIFIVFAVHFYRSLVSHKTDRQFQELNELAEFARLQDQLDHRGDH
PLTPGSHYAGPVATRSLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRN
CRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDV
QYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEK
QLLAVEEGAEKIKKKRNTLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHR
VWQQIEILCGPQIVNNPGIH

[0121]

[表21]

11. BACC S×2 のコンストラクト

BACCS

L1

MGPVG GSGGSLATTLERIEKMF^TDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGKt^CRFLQGPETr)
RAT環 (RDAIDNQTEVTVQLINYTKSGIなF丽 LFHL。?ね醐 調 兀職 則 GVG孔。GTEH~RD
AAEBEGVMLIKIgTAENLQKWLQLTHEVEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFGT
FHVAHSSSLiDVDHKILTAKQALSEVTLALRERIJiRWQ(¾IEILCGFQIVNNPGIHGGSGGSGGGI
LQSR(GSGG8GGSGSIATTLERIEIKNFVITDPRLPI)NPIIFA8I)SFLQLTEYSEEEILGENCRFLG
GPETDRATV¾ KIRDAII)NQTEVTYQLINYTKSGKKFWD LFHLQFMf I)QKGDVQYFI(E¾ LDGT
EHVRDAAERE GVMLIiKKTAENLGf KWLQLTHE、TEVQYYNIKKQNAEKQLLVAKE GAEKIKKKRN
TLFGTFHVAHSSSLDDVDHKILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIH G(GSGG
SGLV

[0122] [表22]

12. YFP-BACCS ×2 のコンストラクト

YFP

BACCS

L1

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFお^EGEGDATY(:aOJLKFICTT(¾ 化PVPWPTLVTT
FGYGLQCF-皿 7PDHMKQHI)FFKSA¾IPE(GYVQERTIFFiDDGNYKTR珊 7KFEGDTLVNRIELK
GIDFEEDGNILGHKLEYNYMSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIR 画 IEDGSVQLJLDHYCIQNTPIG
DGPVLLPDNHYL SYQSAL SKDPNE ER皿 MVIXEFVTAAGITLGMDELYKGr 'VGG SGGSL ATTL
ERIEIMFWDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSI^EILGENCRFLQGPETDRATTOigRDAIDNQTE
VTVQLINYTKStGKKF願 LF皿 DPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKTAE
NLQKWLQLTHEVEVQYYN|亚 QN观 な)LLVAKEGAEKIKKKRNTLFQTFHV¾HSSSLI)DVI)HK
ILTAKQALSEVTAALRERLHRWQQIEILCGFQIVNNPGIHGGSGGSGGGILQSRGGSGGSGGSGS
LATTLERIEKMFVITDPKLPDNPIIFASDSFLQLTEYSEEEILGRNCKFLQGPETDEATVEKIRDAI
DNQTEWVQLINYTKSGKKFWIJHLQPMEDQKGDYQYFIGVQLDGTEHTODAAEEEGVMLI
KKT-, JLQKWLQLTHE~EVQY预 KKQNAEKQLLVAKEGAEKIKKKRNTLFQTFHVAHSSSLD
DVDHKILTAKQALSEVTAALE.EKLHEWQQIEILCGFQIVMNPGIHG GSGG8GLV

[0123] (参考文献)

1. Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 11-21 (2000).

Z, d θ Fθ!!pe, p. θt a!. E unum p!ur!bu
s: mi n l t j p l θ protej nS fro m a s θ l f—p r
o o S S θ S s! ß u p l o d V p r o t θ j ñ 干 r θ u d s a! o t θ o
h n o l. 24, 68—L 6 (Z O O 6).

3. Harpθr, S. IVI", ○hrist!θ, J. IVI. &Gaᒋdnθu
r, K. H. a!s Jupt!on ◦f the 1_0V—Jalpha
h θ l ! X !u1eractiOn actjVatθs phO1O
trojdun kjnasθ actJV!;y-a! oohθmjstr
V 43, L 6 1 8 P—L 6 1 9 2 (Z O O 17).

17. Harpθr, S. IVI", ○Neil, L. &Gadnθr, I<.
H. S1ruotural basis of a phO1OJopi
n l g h t s wit oh. Sojθnce 3 0L, L 6 L- L 17 9 L

D 17 (Z O O 3).

6. Hoβan, p. G., Lθwis, R. s. &Raο, A. Molθ
onlar basjs of oalo J u m s igna l i n β i
n l V m p h o V i θ s: s 干 l IVI and ORAl. Annu. R
θV. l mmunol" Z 8, 17 9 L - 6 3 3 (Z O 1 0).

6. !ma!, T., Sunzuki, IVI" ᵹSakano, H. Odora
nt rOCθp1Or—Derθ J V θ D o A IVI p js d g n a l s P
J rect axona l targθtjng- sojθnce 3L4
, 6 6 7 - 6 6 1 (Z O○6).

L, Kawasaki, 干., Langθ, i. &Feskθ, S. A ᵰn
jnma l rθβu|a1orV dom a jn the ○

terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 385, 49-54 (2009).

8. Kramer, R. H., Fortin, D. L. & Trauner, D. New photochemical tools for controlling neuronal activity. Curr. Opin. Neurobiol. 19, 544-552 (2009).

9. Li, Z. et al. Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits. Cell Res. (2010).

10, Liu, X, & Tonegawa, S, Optogenetics 3, 0, Cell 141, 22-24 (2010).

11. Muik, M. et al. A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels. J. Biol. Chem. 284, 8421-8426 (2009).

12. Mullins, F. M., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E. & Lewis, R. S, STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca2+-dependent inactivation of CRA

○ channels. proc○. Natl. Acad. Sci. U. S.
A. 106, 15496-15600 (2009).

Z3" IVI uzumdar, IVI" α., Tasic, a., IVI! yamichi
i, K., Li, L. ξluo, L. Aβlobal doubl θ—f
luorescent ○re JθportθrmouseGθnθ
si s 45, 593-605 (z007)●

Pd L. Park, C. Yθt ai. STIM1 oinstθJsa
nd activatθs ○Vy○ channθls via dir
θct binding of a ovtosolic domain
to 0rai1. Cθl l 136, 8ヶ6_890 (ZOO9).

T6. Rana, A. Qvolmeischh, R. E. Using liβ
ht to contJol siβnaling oascades i
n l JvθneuJons. ○urr. 0pin. Neurobiol
" Z0, 6LL-622 (2○10).

T6" Saiomon, IVI., ○hristie. J. IVI., Knieb,
E., Lempert, u. ξBrigβs, W. R. photochem
ical and mutaional analysis of th
e FIVIN-binding domains of the plant
b lqθn light receptor, phototropin.
gjo○hemjstrv 39, 94○L—9ヰ10 (2○○○).

TL. Strickland, e., IVIofftal. K. ξSosnick
, 丁. R. Lβht—actiVated Nav bjndjng
n a dεjgnεd allostεrjc protεjn. pr
d. ujεtoprotεin. Cθll. Mol. Life Sci.

c Natl. a 105, 7
1 2

18. Strick and, D. et l. Rationally i mpr ving domain-b e> ph toswi tche . Nat. Methods , 623-626(10).

19. W , Y. I. et . A geneti ally enco ded phot t ctable R c ntrols the m ti ty f living cells. Natur e 1, 104-10 (2 9).

2 uan, . et al. SO R and th pol yba ic S IM1 nain al anc reg late Orai h nnels. Nat. CellBiol. 11 , 337 (2 09).

21 e, ., Eit ku, T., Ziki a a, K., Mat u k, D., Tokutomi, . & era im M. Stabi it f imer an dom in- m n interaction of a idop is phot trop 1 LOV2. J. l. Bi l. 3 3, 90 3 2 .

. M uguch , ., Xu, ., Ishii-Wat e,
h d , ., & yak w , T. IRES-de pende e d gene e pre i i

sinusoidal—dependent power flow in a juncture exposed to a

cyclic stress," J. Mol. Struct., vol. 123, pp. 1-3 (2000).

請求の範囲

[請求項1] 配列番号１または配列番号１と８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬＯＶ２領域と、

配列番号２、配列番号３、またはＬＯＶ２＿Ｊαの光スィッチとしての機能を維持し、かつ配列番号２もしくは３のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＪα領域と、

配列番号４、またはカルシウムチャネル０ｒａｉｌを活性化でき、かつ配列番号４のアミノ酸配列において、１もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなるＣＡＤ領域と、を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、

前記ＬＯＶ２領域、前記Ｊα領域および前記ＣＡＤ領域は、Ｎ末端からＣ末端に向かって、前記ＬＯＶ２領域、前記Ｊα領域および前記ＣＡＤ領域の順で配置され、

前記」α領域のＣ末端と前記ＣＡＤ領域のＮ末端との間にアミノ酸配列が介在していないポリペプチド。

[請求項2] 配列番号５またはカルシウムチャネルとして機能でき、かつ、配列番号５のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなる０ｒａｉ１領域と、

請求項１記載のポリペプチドからなる第１のＢＡＣＣＳ領域と、

請求項１記載のポリペプチドからなる第２のＢＡＣＣＳ領域と、を含むアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、

前記０ｒａｉ１領域、前記第１のＢＡＣＣＳ領域および前記第２のＢＡＣＣＳ領域は、Ｎ末端からＣ末端に向かって、前記０ｒａｉ１領域、前記第１のＢＡＣＣＳ領域および前記第２のＢＡＣＣＳ領域の順で配置されるポリペプチド。

[請求項3] 前記０ｒａｉ１領域のＣ末端と前記第１のＢＡＣＣＳ領域のＮ末端の間に第１のリンカーが介在する請求項２記載のポリペプチド。

[請求項4] 前記第１のＢＡＣＣＳ領域のＣ末端と前記第２のＢＡＣＣＳ領域のＮ末端の間に第２のリンカーが介在する請求項２または３に記載のポリペプチド。

[請求項5] 請求項１記載のポリペプチドからなる第１のＢＡＣＣＳ領域と、

請求項１記載のポリペプチドからなる第２のＢＡＣＣＳ領域と、を含み、かつ、

配列番号５またはカルシウムチャネルとして機能でき、かつ、配列番号５のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加されたアミノ酸配列からなる０ｒａｉ１領域を含まないアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[請求項6] 前記第１のＢＡＣＣＳ領域のＣ末端と前記第２のＢＡＣＣＳ領域のＮ末端の間にリンカーが介在する請求項５に記載のポリペプチド。

[請求項7] 請求項１～６のいずれか１項に記載のポリペプチドをコードする単離された核酸。

[請求項8] 請求項７に記載の核酸を含む組み換えベクター。

[請求項9] 請求項８に記載の組み換えベクターを含む遺伝子導入キット。

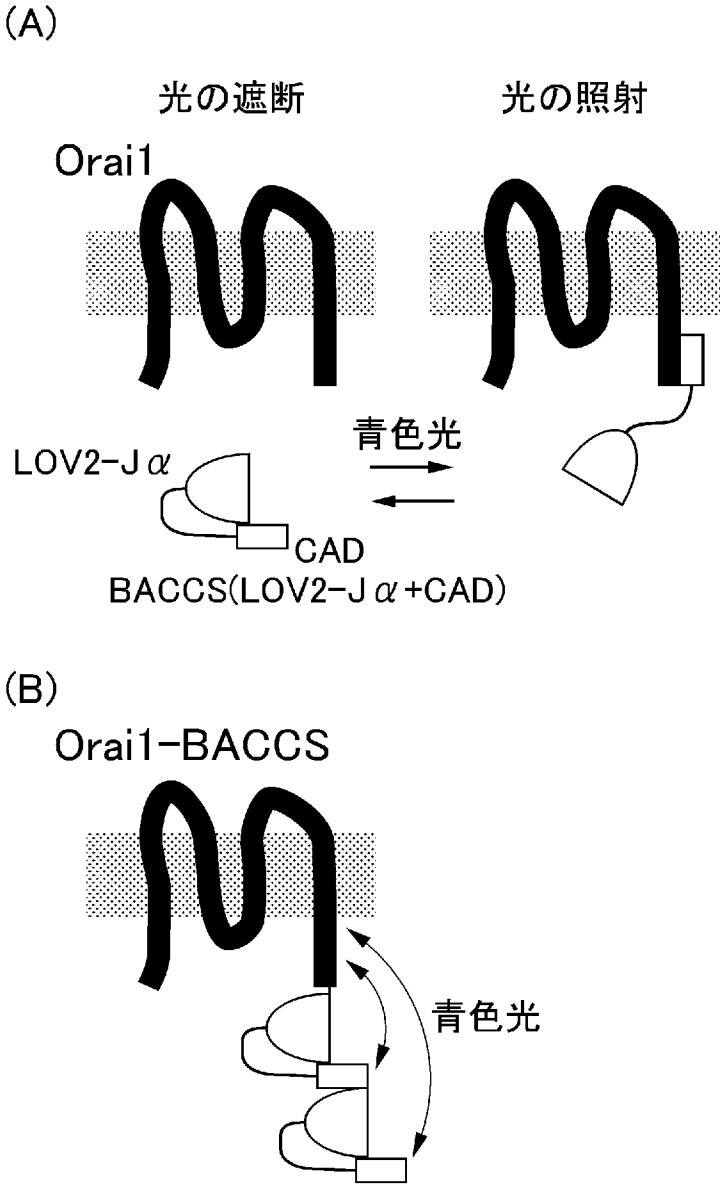
[請求項10] 請求項８に記載の組み換えベクターを含み、単離された細胞または非ヒト動物である形質転換体。

[請求項11] 請求項１０記載の形質転換体に照射する光の強度を操作することによって、前記形質転換体の細胞内カルシウムシグナルを調節する細胞内カルシウムシグナルの調節方法。

[請求項12] 前記ポリペプチドは、請求項１、５または６のいずれか１項に記載のポリペプチドであり、かつ、前記細胞は０ｒａｉｌを発現している請求項１１に記載の細胞内カルシウムシグナルの調節方法。

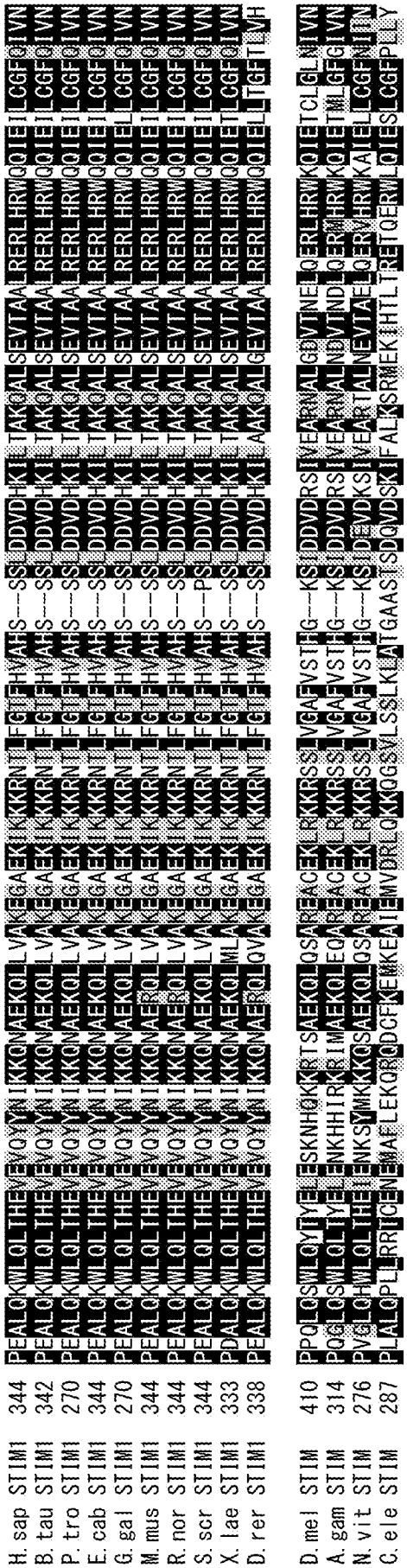
[請求項13] 前記ポリペプチドは、請求項２～４のいずれか１項に記載のポリペプチドである請求項９に記載の細胞内カルシウムシグナルの調節方法。

[図1]

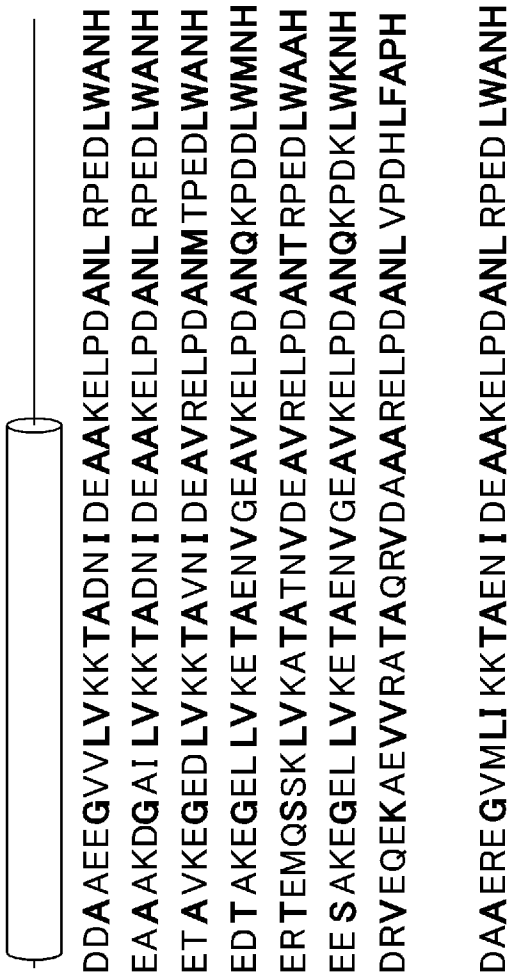

(A)
光の遮断
光の照射
Orai1
青色光
LOV2-Jα
CAD
BACCS(LOV2-Jα+CAD)
(B)
Orai1-BACCS
青色光

[図2A]

[図2B]

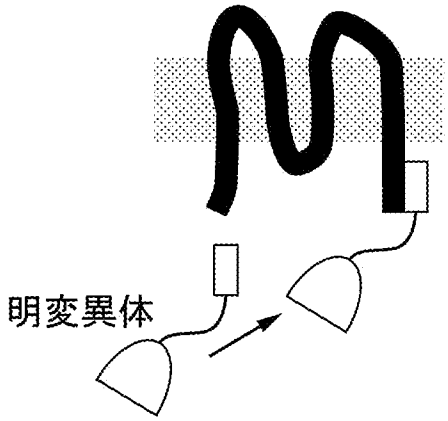

H.sap STIM1 344
B.tau STIM1 342
P.tro STIM1 270
E.cab STIM1 344
G.gal STIM1 270
M.mus STIM1 344
R.nor STIM1 344
S.scr STIM1 344
X.lae STIM1 333
D.rer STIM1 338
D.mel STIM 410
A.gam STIM 314
N.vit STIM 276
C.ele STIM 287

[図3]

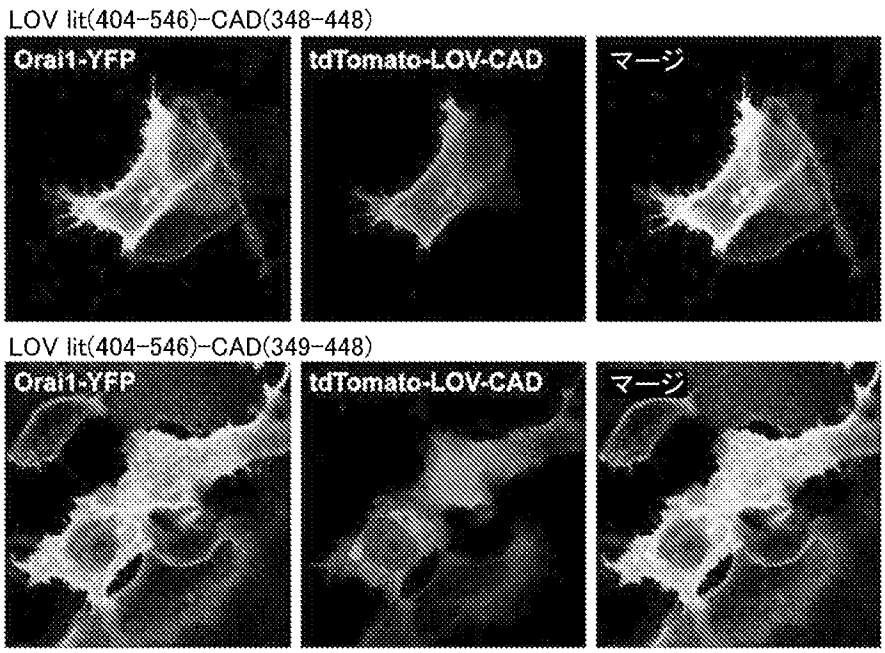

Jα
Os_phot1 522 DDAAEEGVVLVKKTADNIDEAAKELPDANLRPEDLWANH
Zm_phot1 510 EAAAKDGAILVKKTADNIDEAAKELPDANLRPEDLWANH
At_phot1 590 ETAVKEGEDLVKKTAVNIDEAVRELPDANMTPEDLWANH
Ps_phot1 564 EDTAKEGELLVKETAENVGEAVKELPDANQKPDDLWMNH
At_phot2 505 ERTEMQSSKLVKATATNVDEAVRELPDANTRPEDLWAAH
Vf_phot1 558 EESAKEGELLVKETAENVGEAVKELPDANQKPDKLWKNH
Ac_phy3 1050 DRVEQEKAEVVRATAQRVDAAARELPDANLVPDHLFAPH
As_phot1 522 DAAEREGVMLIKKTAENIDEAAKELPDANLRPEDLWANH

[図4]

(A)



(B)

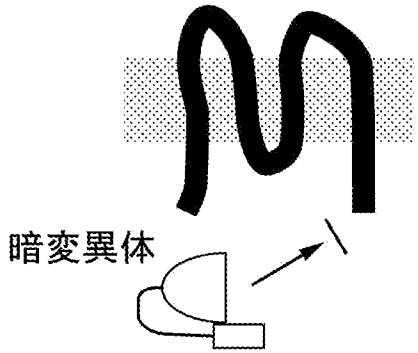


(C)

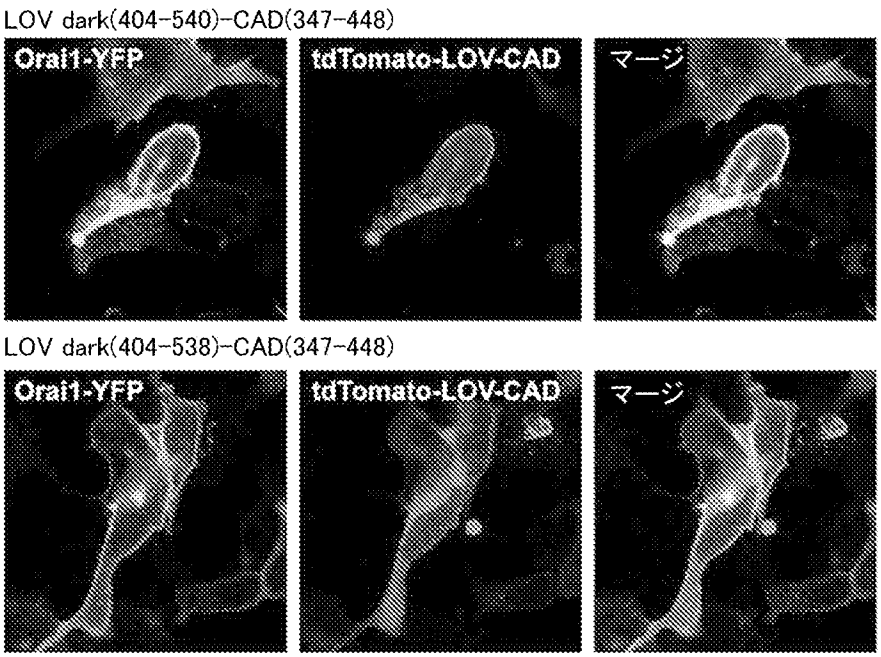
		LOV	CAD	膜への局在化
LOV	lit(404-546)-CAD(342-448)	---TAENIDEAAKEL	**YAPEALQKWLQL**---	あり
LOV	lit(404-546)-CAD(343-448)	---TAENIDEAAKEL	**APEALQKWLQL**---	あり
LOV	lit(404-546)-CAD(344-448)	---TAENIDEAAKEL	**PEALQKWLQL**---	あり
LOV	lit(404-546)-CAD(345-448)	---TAENIDEAAKEL	**EALQKWLQL**---	あり
LOV	lit(404-546)-CAD(346-448)	---TAENIDEAAKEL	**ALQKWLQL**---	あり
LOV	lit(404-546)-CAD(347-448)	---TAENIDEAAKEL	**LQKWLQL**---	あり
LOV	lit(404-546)-CAD(348-448)	---TAENIDEAAKEL	**QKWLQL**---	あり
LOV	lit(404-546)-CAD(349-448)	---TAENIDEAAKEL	**KWLQL**---	なし
LOV	lit(404-546)-CAD(350-448)	---TAENIDEAAKEL	**WLQL**---	なし
LOV	lit(404-545)-CAD(348-448)	---TAENIDEAAKE	**QKWLQL**---	なし
LOV	lit(404-544)-CAD(348-448)	---TAENIDEAAK	**QKWLQL**---	なし
LOV	lit(404-543)-CAD(348-448)	---TAENIDEAA	**QKWLQL**---	なし

[図5]

(A)



(B)



(C)

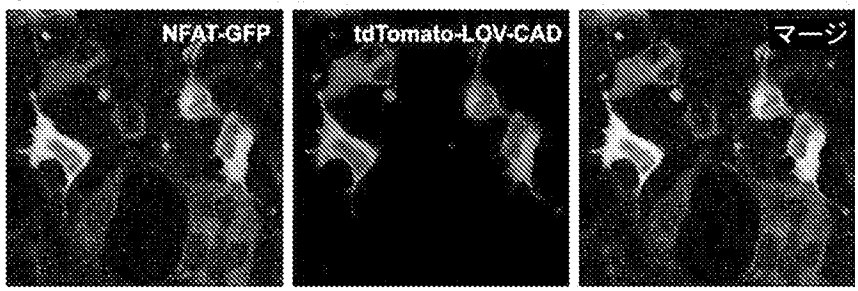
	LOV	CAD	膜への局在化
LOV dark(404-546)-CAD(342-448)	---TAENIDEAAKEL	**YAPEALQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-546)-CAD(343-448)	---TAENIDEAAKEL	**APEALQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-546)-CAD(344-448)	---TAENIDEAAKEL	**PEALQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-546)-CAD(345-448)	---TAENIDEAAKEL	**EALQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-546)-CAD(346-448)	---TAENIDEAAKEL	**ALQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-546)-CAD(347-448)	---TAENIDEAAKEL	**LQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-545)-CAD(347-448)	---TAENIDEAAKE	**LQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-544)-CAD(347-448)	---TAENIDEAAK	**LQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-543)-CAD(347-448)	---TAENIDEAA	**LQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-542)-CAD(347-448)	---TAENIDEA	**LQKWLQL**---	なし
LOV dark(404-541)-CAD(347-448)	---TAENIDE	**LQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-540)-CAD(347-448)	---TAENID	**LQKWLQL**---	あり
LOV dark(404-539)-CAD(347-448)	---TAENI	**LQKWLQL**---	なし
LOV dark(404-538)-CAD(347-448)	---TAEN	**LQKWLQL**---	なし
LOV dark(404-535)-CAD(347-448)	---T	**LQKWLQL**---	なし

[図6]

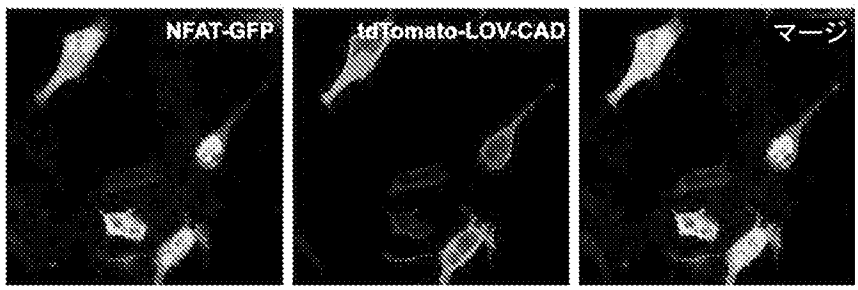
(A)

tdTomato-LOV(404-538)-CAD(347-448) / Orai1 / NFAT-GFP

暗



明

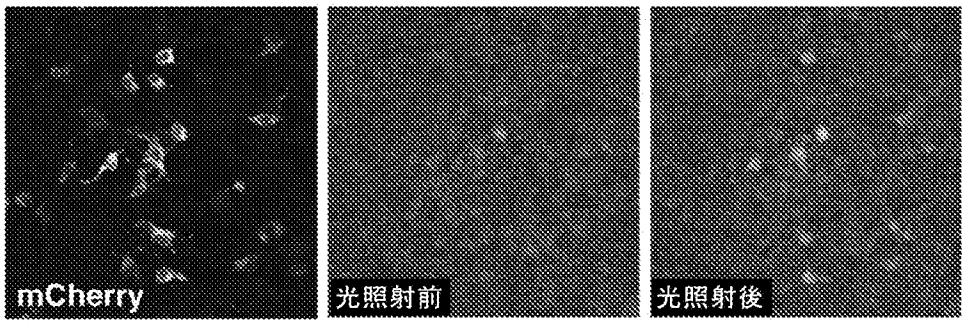


(B)

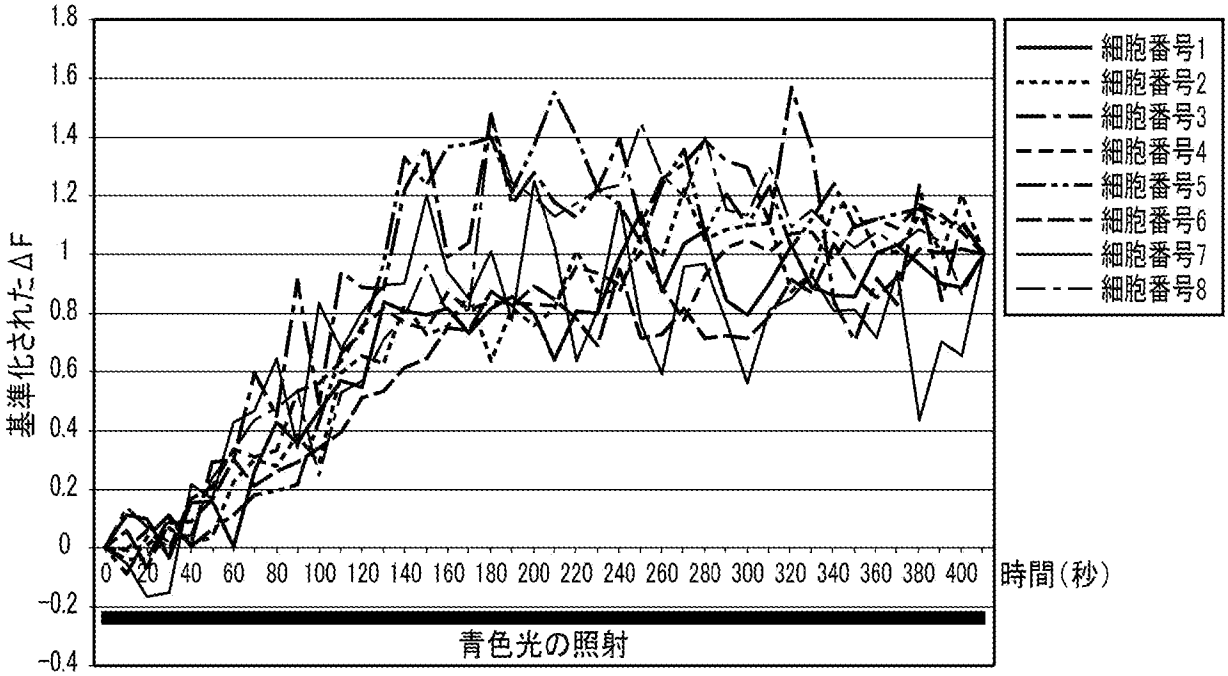
	NFATの核局在化		膜への局在化	
	暗	明	暗	明
LOV(404-542)-CAD(347-448)	−	−	−	−
LOV(404-539)-CAD(347-448)	−	+/−	−	−
LOV(404-538)-CAD(347-448)	−	++	−	++
LOV(404-535)-CAD(347-448)	+	++	++	++

[図7]

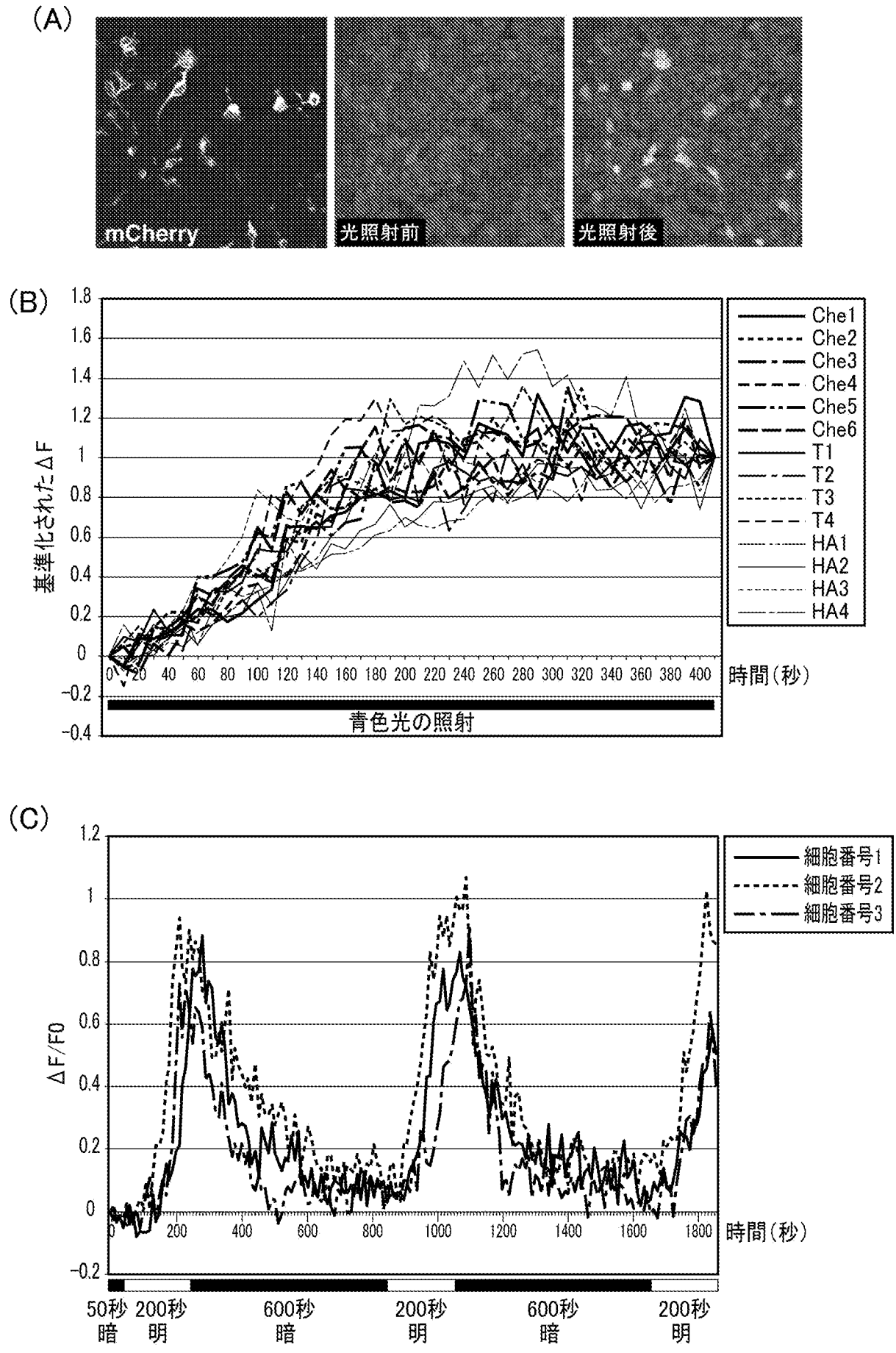
(A)


mCherry
光照射前
光照射後

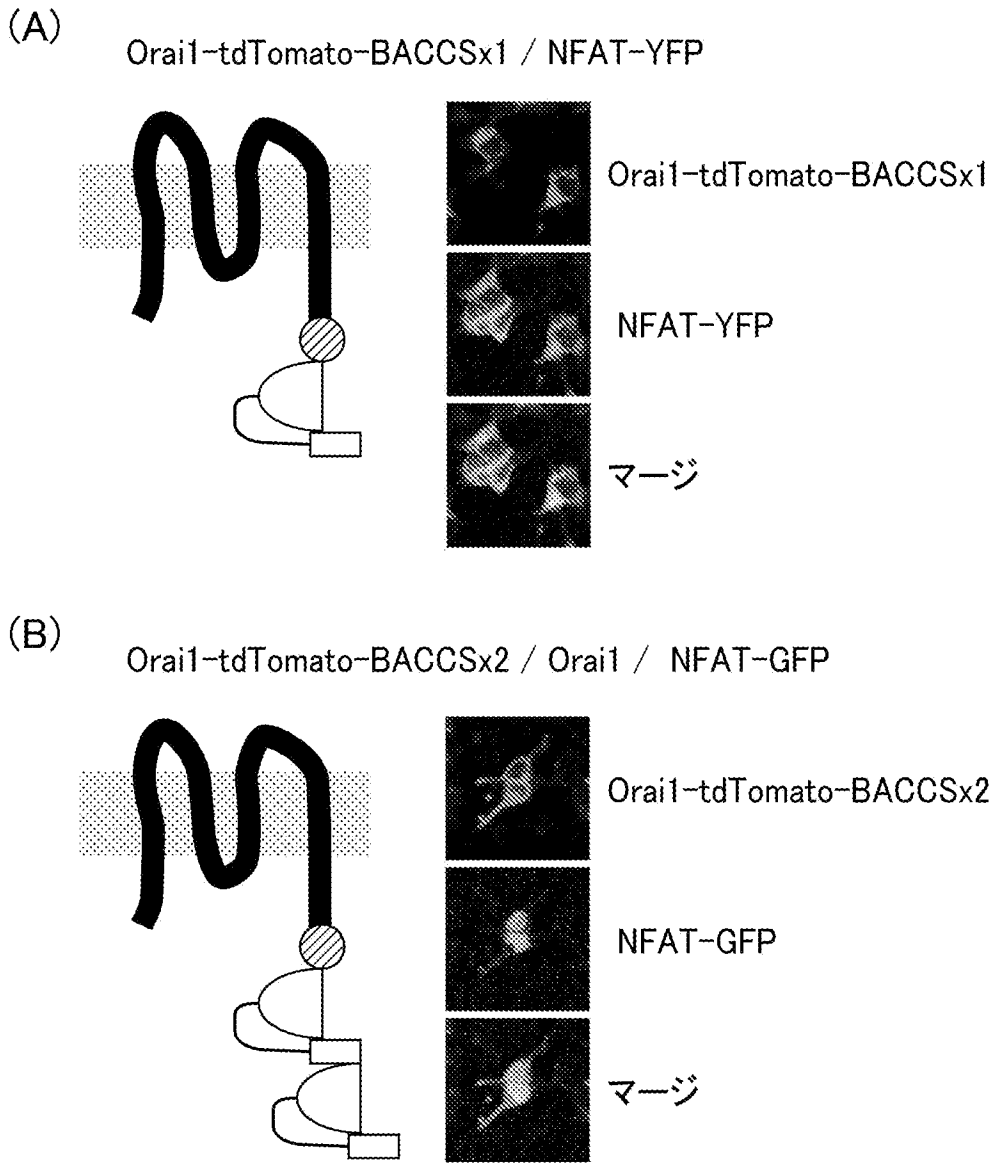
(B)


基準化されたΔF
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360 380 400
時間(秒)
青色光の照射
細胞番号1
細胞番号2
細胞番号3
細胞番号4
細胞番号5
細胞番号6
細胞番号7
細胞番号8

[図8]

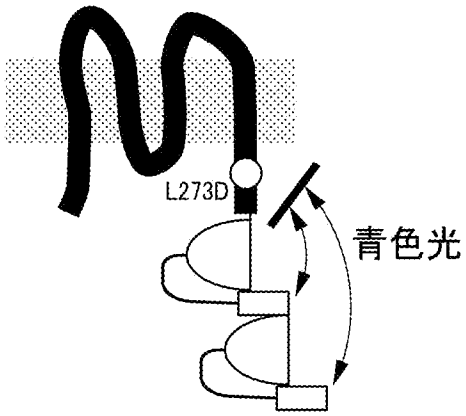

(A)
mCherry
光照射前
光照射後
(B)
基準化されたΔF
時間(秒)
青色光の照射
Che1
Che2
Che3
Che4
Che5
Che6
T1
T2
T3
T4
HA1
HA2
HA3
HA4
(C)
ΔF/F0
時間(秒)
細胞番号1
細胞番号2
細胞番号3
50秒 暗
200秒 明
600秒 暗
200秒 明
600秒 暗
200秒 明

[図9]

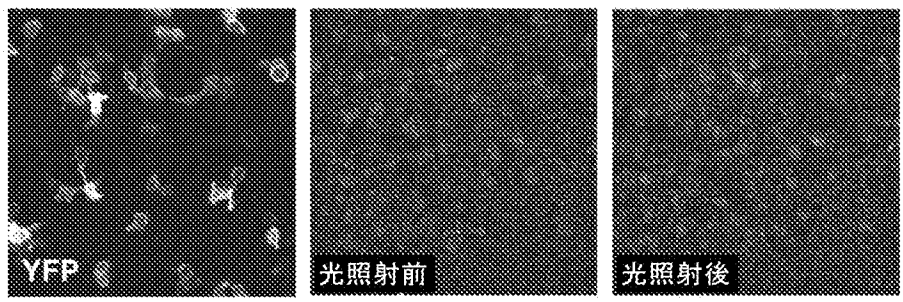

(A)
Orai1-tdTomato-BACCSx1 / NFAT-YFP
Orai1-tdTomato-BACCSx1
NFAT-YFP
マージ
(B)
Orai1-tdTomato-BACCSx2 / Orai1 / NFAT-GFP
Orai1-tdTomato-BACCSx2
NFAT-GFP
マージ

[図10]

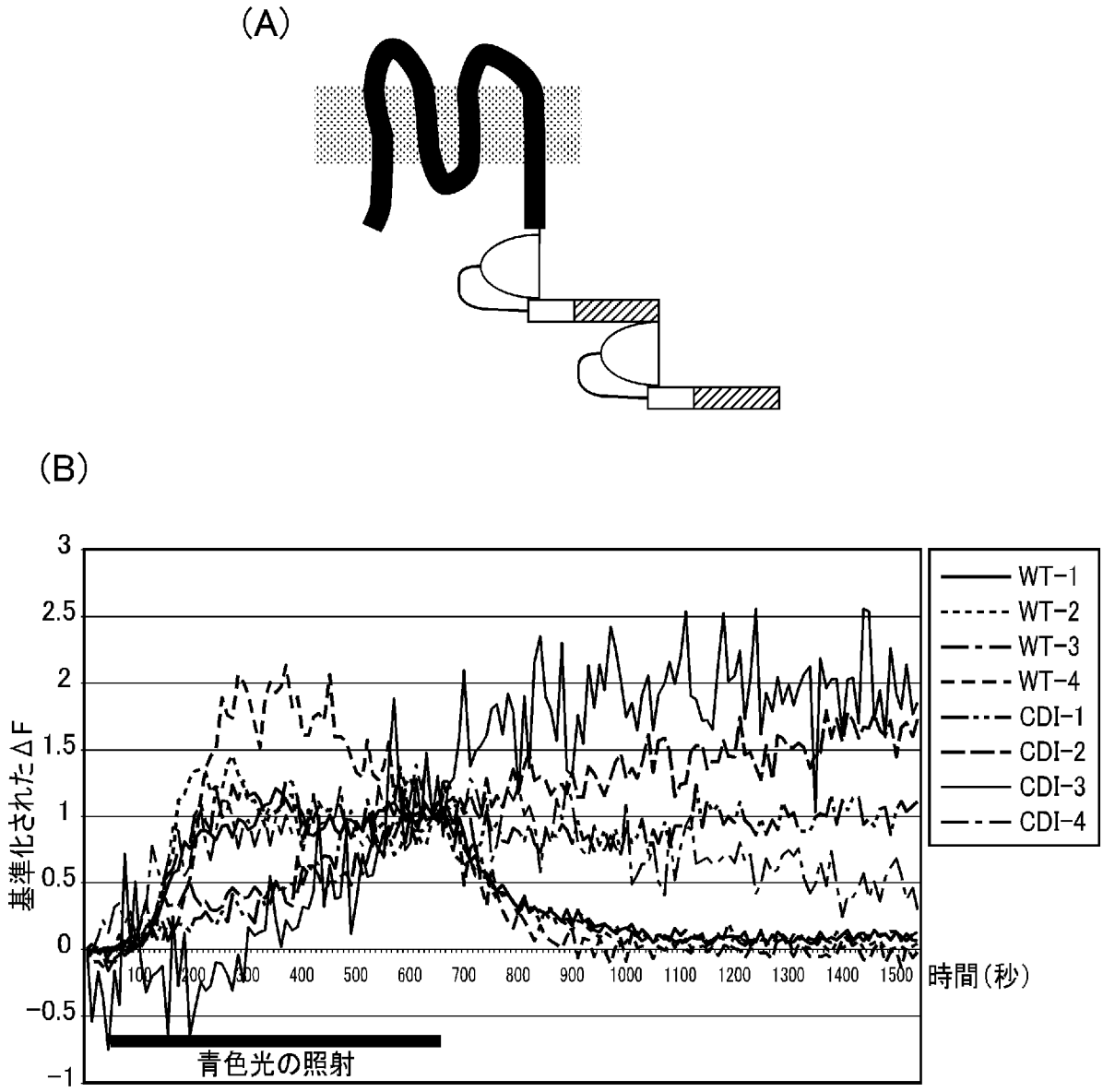
(A)



(B)

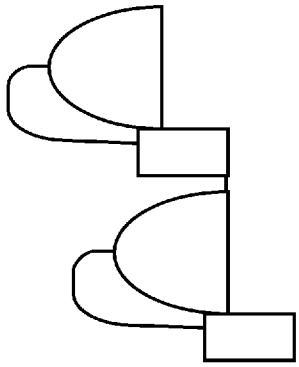


[図11]

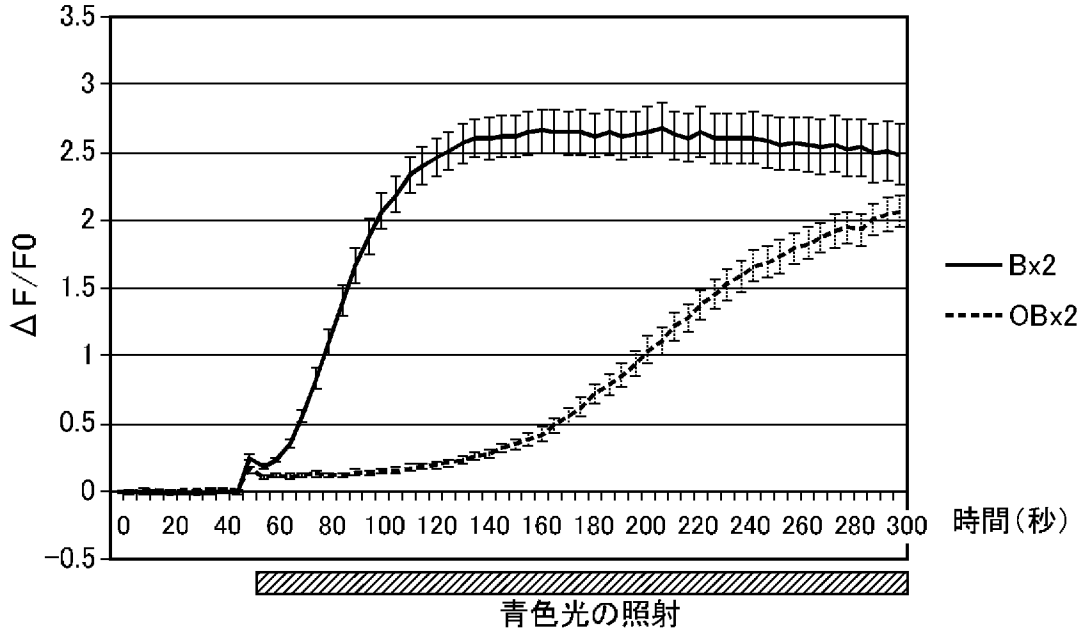

(A)
(B)
基準化されたΔF
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
−0.5
−1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
時間(秒)
青色光の照射
WT−1
WT−2
WT−3
WT−4
CDI−1
CDI−2
CDI−3
CDI−4

[図12]

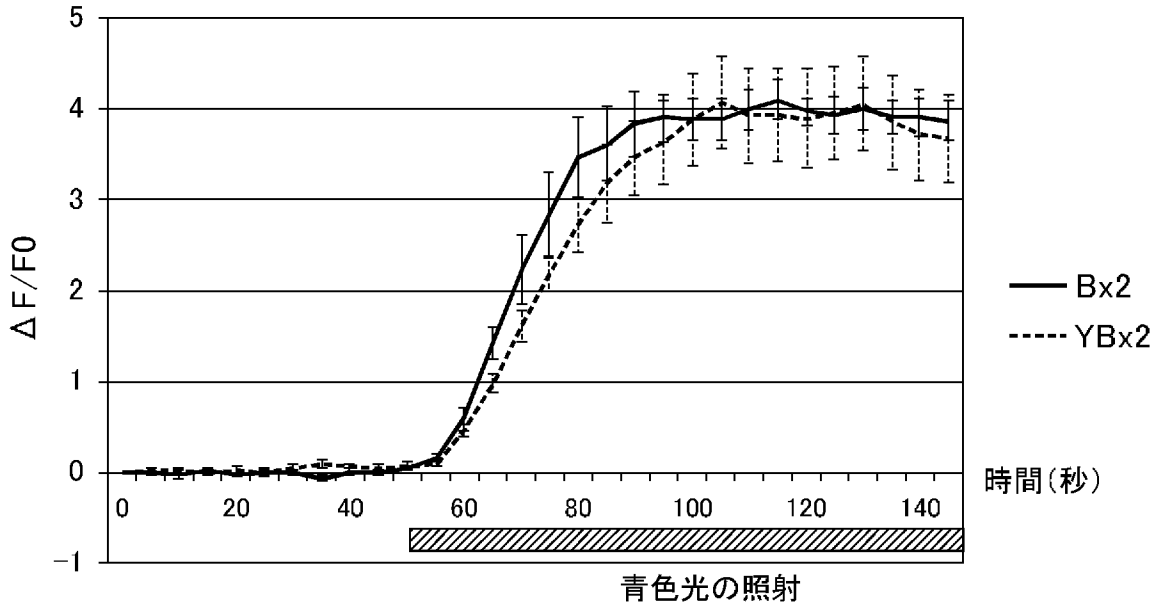
(A) BACCS×2



(B)



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/053705

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1 5/09 (2006.01)i, A01 K 67/02 7(2006.01)i, C07K1 4/41 5(2006.01)i,
C07K1 4/4 7{2006.01)i, CO7K1 9/0 0{2006.01)i, C12N5/1 0{2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1 5/00-15/90, A01K67/027, CO7K1 4/00-19/00, C12N1 /00-7/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1 996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1 971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JST Plus / JME DPlus / JST7580 (JDreaml l), BIOSIS/MEDLINE /WPI DS (STN),
GenBank/ GeneS eq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WU, Y., et al., "A genet ical ly encoded photoaact ivat able Rac cont rols the mot il ity of l iving cells "Nature , 2009, Vol.461, No.3, p.104-108	1-13
Y	PARK, C.Y., et al., "STIM1 clus ters and act ivate s CRAC channe ls via direct bindi ng of a cyto solic domai n to Orai l" Cel l, 2009, Vol .136, p.876-890	1-13
Y	LI, Z., et al., "Graded act ivat ion of CRAC channel by bi nding of di fferent number s of STIM1 to Orai l subuni ts" Cel l Res., 2010.09.14, Vol .21, p.305-315, onl ine	2-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibnion or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying tiie invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 March , 2012 (16.03.12)	03 Apri l, 2012 (03.04.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japane se Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/053705

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAO, X., et al., "Estimation of the available free energy in a LOV2-Ja photoswitch" Nature Chem. Biol., 2008, Vol.4, No.8, p.491-497	1-13
A	JP 2009-533062 A (The Queen's Medical Center), 17 September 2009 (17.09.2009), & EP 2013627 A2 & US 2008/0096227 A1 & WO 2007/121186 A2 & CA 2648588 A & CA 2648588 A & AU 2007238225 A	1-13
A	WO 2010/099401 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY), 02 September 2010 (02.09.2010), (Family: none)	1-13
A	WO 2011/002977 A2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL), 06 January 2011 (06.01.2011), (Family: none)	1-13
A	WO 2009/097133 A2 (MONSANTO TECHNOLOGY, L.L.C.), 06 August 2009 (06.08.2009), & US 2011/0004955 A1	1-13
A	RANA, A & DOLMETSCH, R.E. "Using light to control signaling cascades in live neurons" Cur. Opinion Neurobiol., 2010, Vol.20, p.617-622	1-13

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/053705

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09 (2006.01)i, A01K67/027 (2006.01)i, C07K14/415 (2006.01)i, C07K14/47 (2006.01)i, C07K19/00 (2006.01)i, C12N5/10 (2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/00-15/90, A01K67/027, C07K14/00-19/00, C12N1/00-7/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-
日本国公開実用新案公報 1971-2
日本国実用新案登録公報 1996-
日本国登録実用新案公報 1994-2

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
GenBank/EneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	Wu, Y., et al., "A genetically encoded photoaacti vatable Rac controls the motility of living cells", Nature, 2009, Vol. 461, No. 3, p. 104-108	1-13
Y	PARK, C. Y., et al., "STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orail", Ceil, 2009, Vol. 136, p. 876-890	1-13
Y	LI, Z., et al., "Graded activation of CRAC channel by binding of	2-13

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
16.03.2012	03.04.2012

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員) 4B 3541
水落 登希子
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
	different numbers of STIM1 to Orai1 subunits" Cell Res., 2010. 09. 14, Vol. 21, p. 305-315, online	
A	YA0, X., et al.," Estimation of the available free energy in a LOV2-J α photoswitch" Nature Chera. Biol., 2008, Vol. 4, No. 8, p. 491-497	1-13
A	JP 2009-533062 A (ザ・クイーンズ・メディカル・センター) 2009. 09. 17, EP 2013627 A2 & US 2008/0096227 A1 & WO 2007/121186 A2 & CA 2648588 A & CA 2648588 A & CA 2648588 A & AU 2007238225 A	1-13
A	WO 2010/099401 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2010. 09. 02, (ファミリーなし)	1-13
A	WO 2011/002977 A2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 2011. 01. 06, (ファミリーなし)	1-13
A	WO 2009/097133 A2 (MONSANTO TECHNOLOGY, LLC) 2009. 08. 06, & US 2011/0004955 A1	1-13
A	RANA, A & DOLMETSCH, R. E. "Using light to control signaling cascades in live neurons" Cur. Opinion Neurobiol., 2010, Vol. 20, p. 617-622	1-13